



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara

Lívia Bessa de Paula Pereira

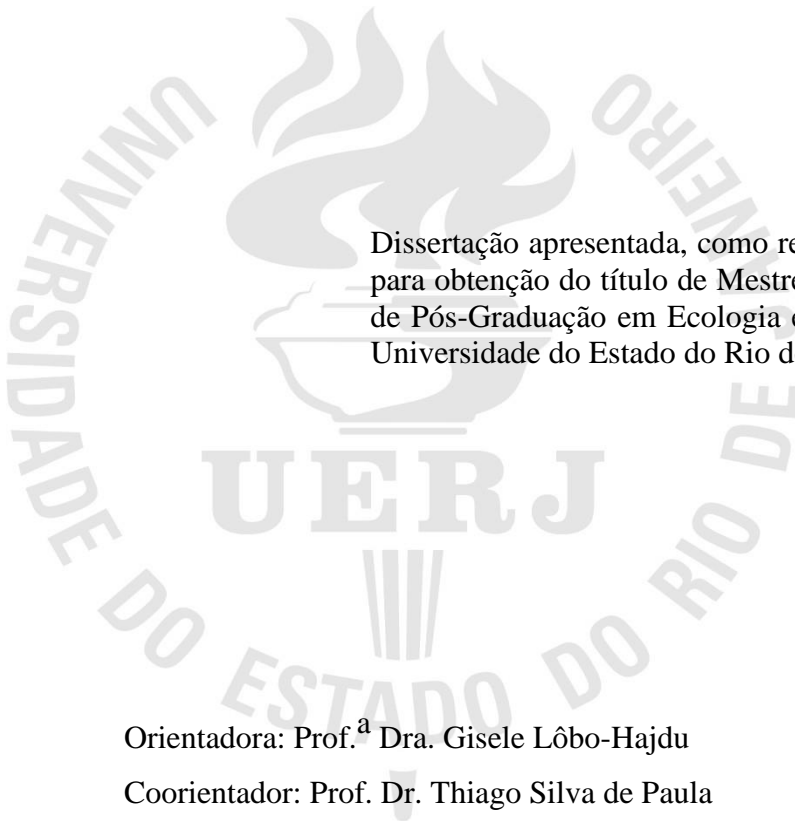
**Presença de herpesvírus associado ao fibropapiloma em tartarugas verdes  
(*Chelonia mydas*) da região de forrageamento de Angra dos Reis, R.J.**

Rio de Janeiro

2022

Lívia Bessa de Paula Pereira

**Presença de herpesvírus associado ao fibropapiloma em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) da região de forrageamento de Angra dos Reis, R.J.**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Lôbo-Hajdu

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Silva de Paula

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA

P436 Pereira, Livia Bessa de Paula.  
Presença de herpesvírus associado ao fibropapiloma em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) da região de forrageamento de Angra dos Reis, R.J. – 2022.  
80f.: il.

Orientadora: Gisele Lôbo-Hajdu  
Coorientador: Thiago Silva de Paula  
Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Tartaruga marinha - Angra dos Reis (RJ) - Teses. 2. Vírus do herpes - Teses. 3. Tartaruga marinha - Doenças - Teses. I. Lôbo-Hajdu, Gisele. II. Paula, Thiago Silva de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 598.133(81)

Patricia Bello Mejjinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Livia Bessa de Paula Pereira

---

Data

Lívia Bessa de Paula Pereira

**Presença de herpesvírus associado ao fibropapiloma em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) da região de forrageamento de Angra dos Reis, R.J.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Anderson Vilasboa de Vasconcellos  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanderlaine Amaral de Menezes  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. André Resende de Senna  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Vinicius Neres de Lima  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro  
2022

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, minha base em todos os sentidos, e às tartarugas marinhas, o meu grupo de estudo*

## **AGRADECIMENTOS**

‘A CAPES pela concessão da bolsa de estudos’.

‘A minha orientadora, Prof. Dra. Gisele Lôbo por me dar a oportunidade de realizar o presente trabalho sob sua orientação e de aprender em todos os sentidos da vida’.

‘Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Silva de Paula pela idealização do projeto e auxílio nas análises dos resultados, bem como pela disposição em ajudar sempre.’

‘Aos professores e equipe do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução – PPGEE, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro’.

‘A todos que direta e/ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica e para essa pesquisa’

‘A minha psicóloga Danielly Pierre por me guiar durante todo esse período de trabalho’.

‘Ao meu namorado, Lucas Azevedo por estar comigo nos momentos difíceis’.

‘Aos meus pais, Dayse e Levi por sempre acreditarem no meu potencial’.

‘A minha avó, Vilma por me apoiar’.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se alcançar um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

*José de Alencar.*

## RESUMO

PEREIRA, Livia Bessa de Paula. *Presença de herpesvírus associado ao fibropapiloma em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) da região de forrageamento de Angra dos Reis, R.J.* 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A costa brasileira é habitada por cinco espécies de tartarugas marinhas (Tetrapoda, Chelonioidea), que utilizam este território como área de reprodução e alimentação. A preservação desses animais vem sendo ameaçada por atividades humanas, notadamente poluição dos oceanos por resíduos sólidos e interações com artefatos de pesca. O litoral do Estado do Rio de Janeiro é considerado de extrema importância para a conservação das tartarugas marinhas, seja por abrigar as áreas latitudinais limítrofes de reprodução ou diversas áreas de alimentação espalhadas por toda sua extensão litorânea. Este projeto visa examinar as variantes virais do herpesvírus associado a fibropapilomas de tartarugas (o alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo, ChHV5) na área de alimentação da região de Angra dos Reis (R.J.), no período de 2013 a 2016. Amostras de tumor e de tecido saudável foram coletadas de 43 tartarugas verdes que apresentavam fibropapilomas, e submetidas a extrações de DNA genômico total, e ampliações por PCR de um fragmento do gene da DNA polimerase (DNApol) do genoma viral usando os primers senso e reverso, GTHV2 e GTHV3, respectivamente. Os resultados indicaram que a prevalência da fibropapilomatose em tartarugas-verdes da área de alimentação da região de Angra dos Reis (R.J.), no período de 2013 a 2016, foi de 14,4% (58 tartarugas acometidas em 404 capturadas pelo programa PROMONTAR-Angra). Não foi observada relação entre a temperatura alta na região onde se localiza o Efluente das Usinas (Piraquara) e maior incidência de fibropapilomatose. Observou-se que a quantidade de DNA viral de tumores biopsiados (maior rendimento) e de pele saudável (menor rendimento) apresentou grande variação independente do ano, idade ou localização geográfica de coleta, implicando um papel na etiologia da fibropapilomatose, podendo refletir o estágio de desenvolvimento do tumor. Foram identificados dois haplótipos, correspondentes as variantes virais do herpesvírus ChHV5, aqui denominadas B7 (N=15, 71,4%), e B8 (N=6, 28,6%), nas 21 amostras que tiveram sucesso na amplificação e sequenciamento. Não houve diferença significativa na ocorrência das variantes virais do herpesvírus das tartarugas verdes de Angra dos Reis (R.J.) e as outras áreas de reprodução e forrageamento no Brasil.

Palavras-chave: Tartarugas marinhas. CFPHV (herpesvírus quelonídeo associado ao fibropapiloma). ChHV5 (Alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo). Fibropapilomatose. Co-evolução Parasita-Hospedeiro.



## ABSTRACT

PEREIRA, Livia Bessa de Paula. *Presence of herpesvirus associated with fibropapilloma in green turtles (*Chelonia mydas*) from the foraging region of Angra dos Reis, R.J.* 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The Brazilian coast is inhabited by five species of sea turtles (Tetrapoda, Chelonioida), which use this territory as a breeding and feeding area. The preservation of these animals has been threatened by human activities, notably ocean pollution by solid waste and interactions with fishing artifacts. The coast of the State of Rio de Janeiro is considered of extreme importance for the conservation of sea turtles, either because it shelters the latitudinal bordering areas of reproduction, or several feeding areas spread along its entire coastline. This project aims to examine the viral variants of the fibropapilloma-associated chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV5) in the foraging area of Angra dos Reis (R.J.) region, in the period of 2013 to 2016. Tumor and healthy tissue samples were collected from 43 green turtles that had fibropapillomas and subjected to total genomic DNA extractions and PCR amplifications of a DNA polymerase (DNApol) gene fragment from the viral genome, using the sense and reverse primers, GTHV2 and GTHV3, respectively. The results indicated that the prevalence of fibropapillomatosis in green turtles from the feeding area of the region of Angra dos Reis (R.J.), in the period from 2013 to 2016, was 14.4% (58 turtles affected in 404 captured by the PROMONTAR-Angra program). No relationship was observed between the high temperature in the region where the Plant Effluent (Piraquara) is located and the higher incidence of fibropapillomatosis. It was observed that the amount of viral DNA from biopsied tumors (higher performance) and from healthy skin (lower performance) exhibited a wide variation regardless of the year, age or geographic location of collection, implying a role in the etiology of fibropapillomatosis, and may reflect the stage of tumor development. Two haplotypes were identified, corresponding to the viral variants of the ChHV5 herpesvirus, here called B7 (N=15, 71.4%), and B8 (N=6, 28.6%), in the 21 samples that were successful in amplification and sequencing. There was no significant difference in the occurrence of viral variants of herpesvirus in green turtles from Angra dos Reis (R.J.) and other breeding and foraging areas in Brazil.

Keywords: Sea turtles. CFPHV (fibropapilloma-associated chelonid herpesvirus). ChHV5 (Chelonid alphaherpesvirus 5). Fibropapillomatosis. Parasite-Host co-evolution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de crânios.....	14
Figura 2 -	Hipóteses alternativas para a posição filogenética de Testudines.....	15
Figura 3-	Hipótese filogenética de evolução dos Testudines, com destaque para os Cryptodira.....	16
Figura 4 -	Características morfológicas típicas da tartaruga.....	18
Figura 5 -	Etapas do ciclo de vida das tartarugas marinhas.....	20
Figura 6 -	Placas de <i>Chelonia mydas</i> .....	22
Figura 7 -	<i>Chelonia mydas</i> forrageando em gramas marinhas.....	22
Figura 8 -	Distribuição de <i>Chelonia mydas</i> no globo.....	23
Figura 9 -	Árvore filogenética bayesiana inferida da região controle mitocondrial (384 pares de bases, bp) de tartarugas verdes, <i>Chelonia mydas</i> .....	24
Figura 10 -	Estado de conservação de <i>Chelonia mydas</i> .....	25
Figura 11 -	Itens de resíduos sólidos (lixo) comidos e letais para tartarugas marinhas.	26
Figura 12 -	Tendências na captura acidental da pesca com rede de emalhe e índices de abundância de tartarugas marinhas nas águas da Carolina do Norte...	27
Figura 13 -	Frequência de captura acidental de espécies de tartarugas marinhas no estado do Rio de Janeiro, de acordo com relatos de pescadores.....	28
Figura 14 -	Detecção global de Herpesvírus associado ao Fibropapiloma de quelonídeo (CFPHV).....	31
Figura 15 -	Fibropapilomas em tartarugas capturadas em Angra dos Reis (RJ).....	32
Figura 16 -	Área coberta pelos mergulhos de captura incidental.....	39
Figura 17 -	Prevalência de fibropapilomatose nas tartarugas marinhas registradas pela Rede Remota de Resgate de Encalhes e por mergulho de captura intencional nas praias de Angra dos Reis (RJ).....	42
Figura 18 -	Representação gráfica dos indivíduos capturados intencionalmente com fibropapilomatose nas áreas cobertas pela captura intencional por mergulho em Angra dos Reis, RJ.....	43
Figura 19 -	Gel de 0,8% de agarose para quantificação da extração de DNA genômico total.....	49
Figura 20 -	Gel 1,5% de agarose para verificação da amplificação do fragmento da DNA polimerase (DNAPol) do alfa-herpesvírus 5 quelonídeo por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	50
Figura 21 -	Eletroferograma do sequenciamento de três amostras do fragmento da DNA polimerase (DNAPol) do herpesvírus quelonídeo de <i>Chelonia mydas</i> .....	54
Figura 22 -	Árvore de Máxima Verosimilhança da relação entre as variantes encontradas neste estudo e em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.....	57
Figura 23 -	Rede da relação entre as variantes da linhagem B encontradas neste estudo e em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Relação do Comprimento Curvilíneo de Carapaça (CCC) para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe) .....	46
Gráfico 2 -	Relação da Largura Curvilínea de Carapaça (LCC) para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe) .....	47
Gráfico 3-	Relação do peso dos indivíduos amostrados para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe) .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados das amostras de tartarugas-verdes, coletadas vivas por mergulho de captura intencional.....	44
Tabela 2 -	Dados das amostras de tartarugas-verdes coletadas por meio de rede remota de encalhes.....	45
Tabela 3 -	Resultado e concentrações em ng/ $\mu$ L das extrações de DNA genômico total de amostras de Tecido Saudável (TS), Papiloma (P) e Sangue (S)..	48
Tabela 4 -	Resultado das ampliações por PCR do fragmento do gene da DNA polimerase (DNAPol) do genoma viral, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P).....	51
Tabela 5 -	Resultado do sequenciamento Sanger usando separadamente os primers senso e antisenso, GTHV2 e GTHV3, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P).....	53
Tabela 6 -	Identificação das variantes do ChHV5, em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.....	55
Tabela 7 -	Identificação das variantes do ChHV5, com N° de Acesso, Ano de coleta das amostras, País / Região, tipo de Grupo / Variante, % de variantes, em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.....	62

## SUMÁRIO

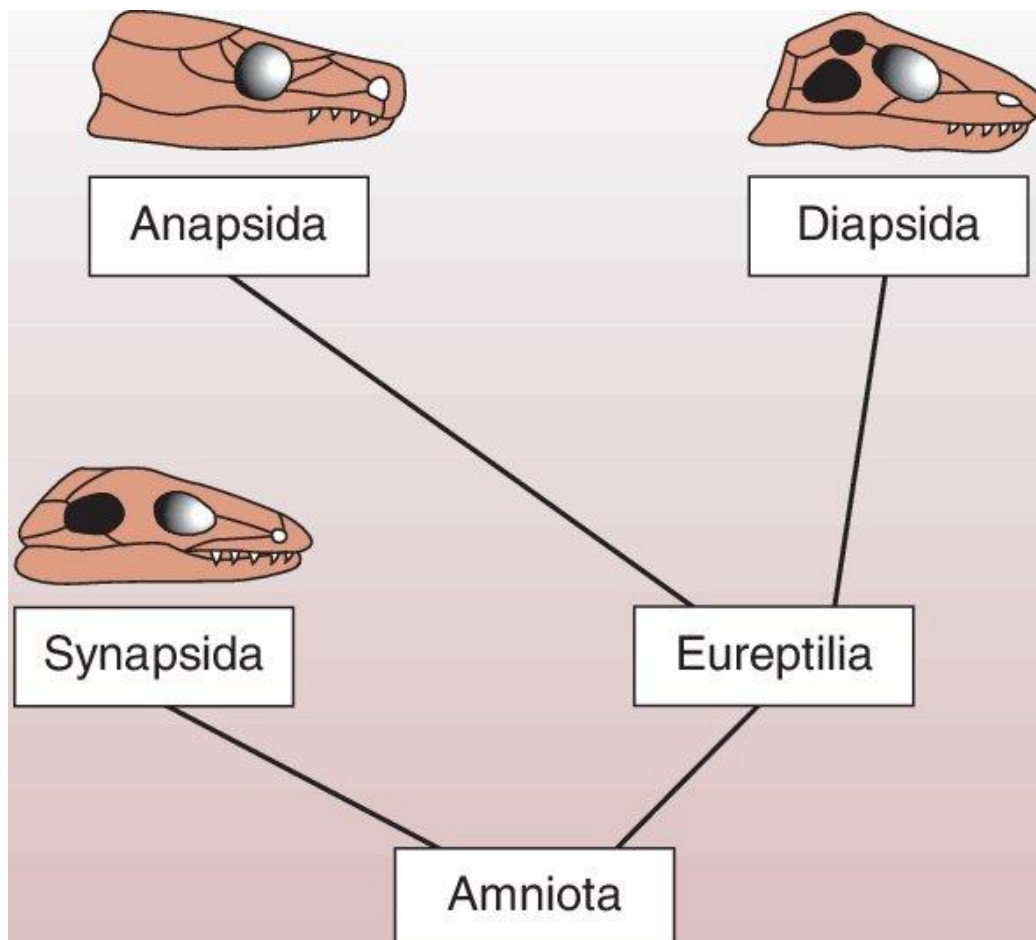
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	30
1.1	<b>O herpesvírus e a fibropapilomatose</b> .....	30
1.1.1	<u>O que é a fibropapilomatose?</u> .....	30
1.1.2	<u>Manifestação clínica</u> .....	31
1.1.3	<u>Grupo-alvo e disseminação da doença</u> .....	33
1.1.4	<u>Os impactos ambientais e a incidência da FP</u> .....	34
1.2	<b>Abordagens moleculares no estudo da relação herpesvírus-tartaruga</b> .....	35
1.2.1	<u>Filogeografia do vírus</u> .....	36
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	37
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	37
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1	<b>Amostragem e Desenho Amostral</b> .....	38
3.2	<b>Extração de DNA total de amostras de tartarugas marinhas</b> .....	39
3.3	<b>Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	40
3.4	<b>Quantificação dos produtos de PCR em gel de agarose</b> .....	40
3.5	<b>Sequenciamento dos produtos amplificados</b> .....	41
3.6	<b>Análises utilizando sequências de nucleotídeos e frequências haplotípicas</b> 41	
4	<b>RESULTADOS</b> .....	42
4.1	<b>Amostragem</b> .....	42
4.2	<b>Extração de DNA total de amostras de tartarugas-verdes com fibropapilomatose</b> .....	49
4.3	<b>Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	50
4.4	<b>Sequenciamento dos produtos amplificados</b> .....	52
4.5	<b>Análises utilizando sequências de nucleotídeos e frequências haplotípicas</b> 54	
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
	<b>ANEXO A - Outros experimentos realizados durante a pesquisa</b> .....	75
	<b>ANEXO B – Cópia da Autorização para atividades com finalidade científica</b> . 77	

## INTRODUÇÃO

### Aspectos evolutivos sobre as tartarugas marinhas

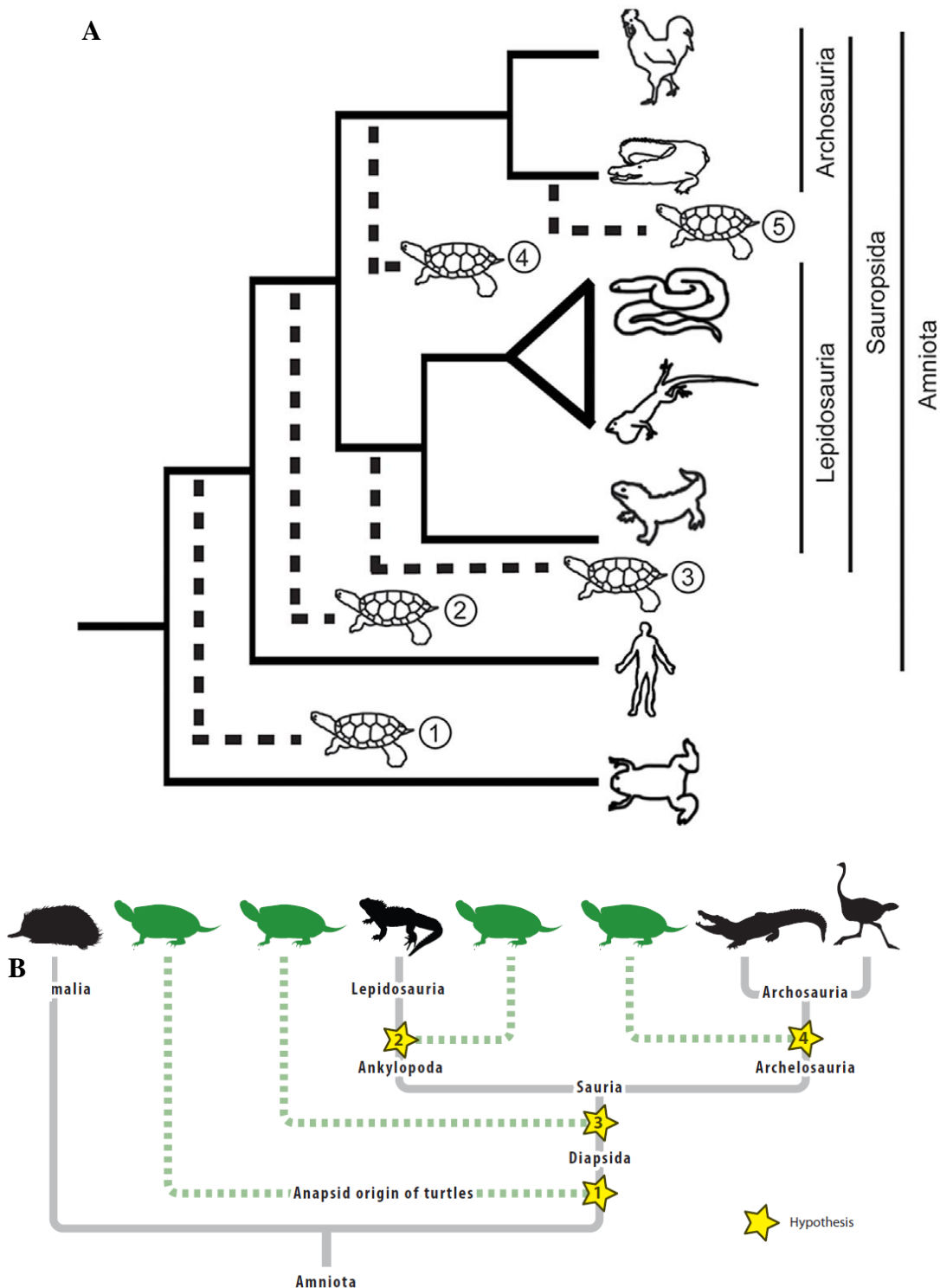
O surgimento dos primeiros representantes da Ordem Testudines (Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Reptilia), se deu no Triássico Superior há pelo menos 220 milhões de anos atrás (RIEPPPEL & REISZ 1999; FONG et al. 2012; WALKER et al. 2018; EVERS & BENSON 2019). A evolução dos Testudines, ainda é controversa, havendo quatro hipóteses principais: i) Hipótese Anapsida, a condição anapsídea (do grego, ‘An’ = sem, + ‘apsis’ = arco)(Figura 1), caracterizada por não apresentar fenestra temporal pós-orbital, indica que as tartarugas representam o grupo mais basal de amniotas vivos, e são intimamente relacionados ou mesmo um ramo existente dos para-répteis anapsídeos (répteis inicialmente divergentes) (Figura 1 e Figura 2; GAUTHIER et al. 1988; REISZ & LAURIN 1991; LAURIN & REISZ 1995; HEDGES 2012; LEE 1997a,b); ii) Hipótese Diapsida, hipótese baseada na morfologia, as tartarugas são répteis diápsidos (do grego, ‘Di’ = duplo, + ‘apsis’ = arco), mas estão posicionadas fora do grupo principal dos Sauria (pássaros, crocodilos, lagartos e tuatara, BEVER et al. 2015); iii) Hipótese Archosauria, os Testudines teriam origem diapsida, com uma relação de grupo-irmão com os Arcosauros (linhagem que inclui crocodilianos e pássaros, subdivisão da linhagem Sauria), formando o clado Archelosauria, hipótese baseada em dados moleculares (Figura 1 e 2; ZARDOYA & MEYER 2001, IWABE et al. 2005, MATSUDA et al. 2005, HUGALL et al. 2007, SHEN et al. 2011, TZIKA et al. 2011, CHIARI et al. 2012, CRAWFORD et al. 2012, 2015, FONG et al. 2012, LU et al. 2013, SHAFFER et al. 2013, WANG et al. 2013, FIELD et al. 2014); iv) Hipótese Lepidosauria, as tartarugas são posicionados dentro do grupo principal de saúrios, como grupo irmão do clado lagarto-cobra-tuatara (Lepidosauria) (Figura 2) (RIEPPPEL & deBRAGA 1996, deBRAGA & RIEPPPEL 1999; WANG et al. 2013; POUGH et al. 2015) - uma hipótese filogenética que continua viável e ainda é muito discutido entre os paleontologistas (HILL 2005; LI et al. 2008, 2018; LYSON et al. 2012; BEVER et al. 2015; SCHOCH & SUES 2015).

**Figura 1** - Tipos de crânios: sinapsídeo (Synapsida, crânio com uma abertura temporal, mamíferos), anapsídeo (Anapsida, crânio sem abertura temporal atrás da órbita ocular, tartarugas) e diápsídeo (Diapsida, crânio com duas aberturas temporais, uma lateral e uma dorsal, outros répteis + aves), mostrando suas relações evolutivas hipotéticas. Fenestra temporal indicada por áreas enegrecidas; as órbitas (órbitas dos olhos) estão sombreadas.



Fonte: Adaptado de MARTIN, 2001.

**Figura 2** - Hipóteses alternativas para a posição filogenética de Testudines (tartarugas).



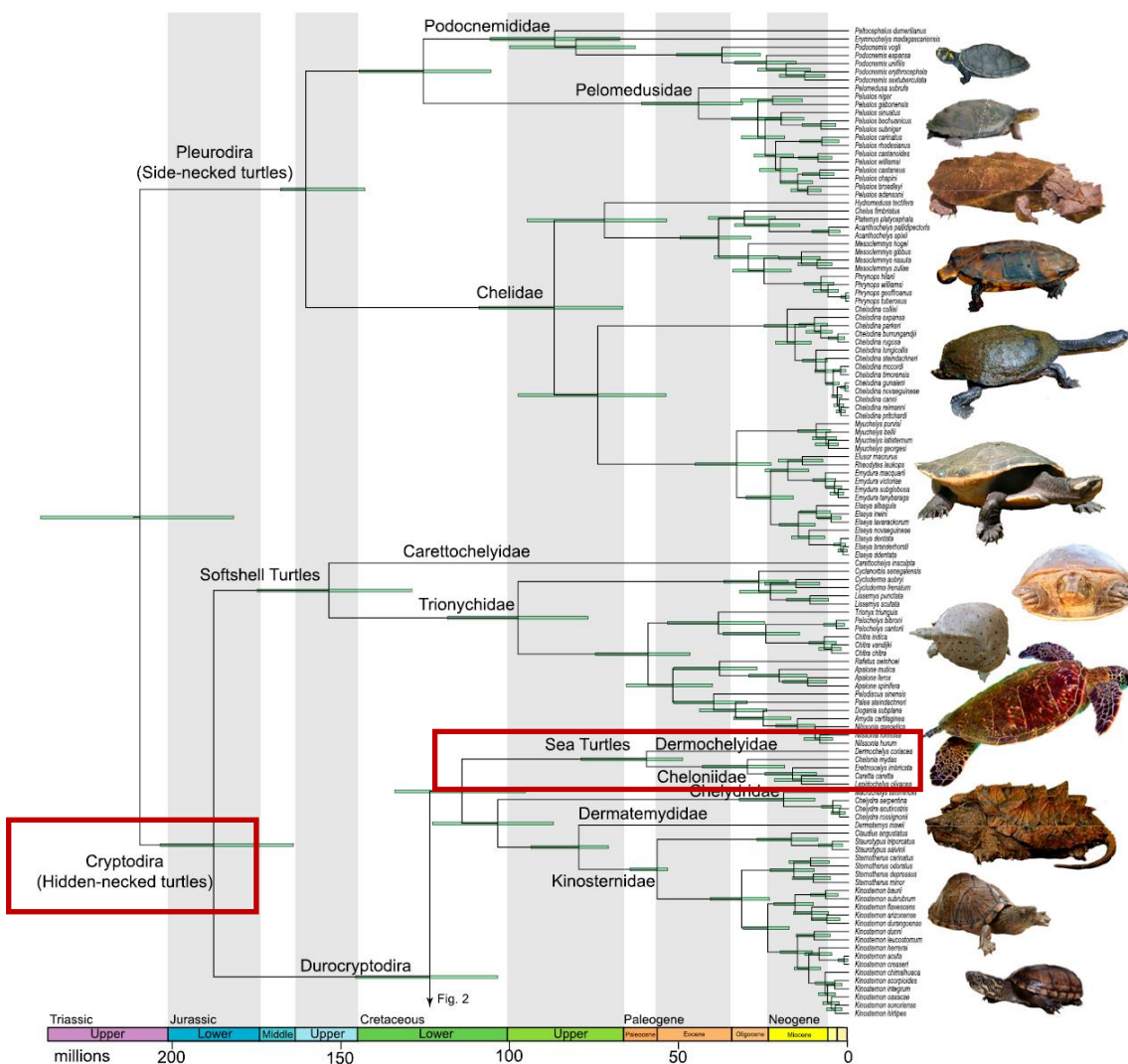
Legenda: (A) As cinco hipóteses alternativas para a colocação de tartarugas dentro de amniotas 1) tartarugas como amniotas basais, 2) tartarugas como saurópsidas basais, 3) grupo-irmão tartaruga-lepidossauro, 4) grupo-irmão tartaruga-arcossauro e 5) grupo-irmão tartaruga-crocodilo. (B) 1) Hipótese Anapsida, tartarugas grupo-irmão de répteis anapsídeos precoces, filogenias baseadas em morfologia; 2) Hipótese Lepidosauria ou Ankylopoada, tartarugas são répteis diápsidos, posicionados dentro de Sauria, como grupo-irmão dos lepidossauros (lagartos + tuatara); 3) Hipótese Diapsida, tartarugas são répteis diápsidos, mas estão posicionados fora de Sauria; 4) Hipótese Archelosauria, tartarugas dentro de Sauria como grupo-irmão dos Archosauria (aves e crocilianos). Fontes: (A) retirado de FONG et al., 2012; (B) retirado de LYSON & BEVER, 2020.



Mesmo usando abordagens moleculares, a inconsistência ainda permanece (HEDGES et al 1990; TZIKA et al 2011; CHIARI et al. 2012; CRAWFORD et al. 2012, PEREIRA et al., 2017; EVERS & BENSON 2019; THOMSON et al., 2021). Contudo, a questão da importância da morfologia da região temporal no crânio dos tetrápodes ainda está em discussão, com novas propostas de classificações com base na evolução das diferentes aberturas temporais em Amniota (mamíferos, aves e répteis) (ABEL & WERNEBURG 2021).

O grupo dos Testudines é composto por duas linhagens com taxa contemporâneos: Cryptodira, tartarugas de pescoço escondido, e Pleurodira, tartarugas de pescoço lateral (Figura 3, THOMSON et al., 2021).

**Figura 3** - História evolutiva dos Testudines, com destaque para os Cryptodira.



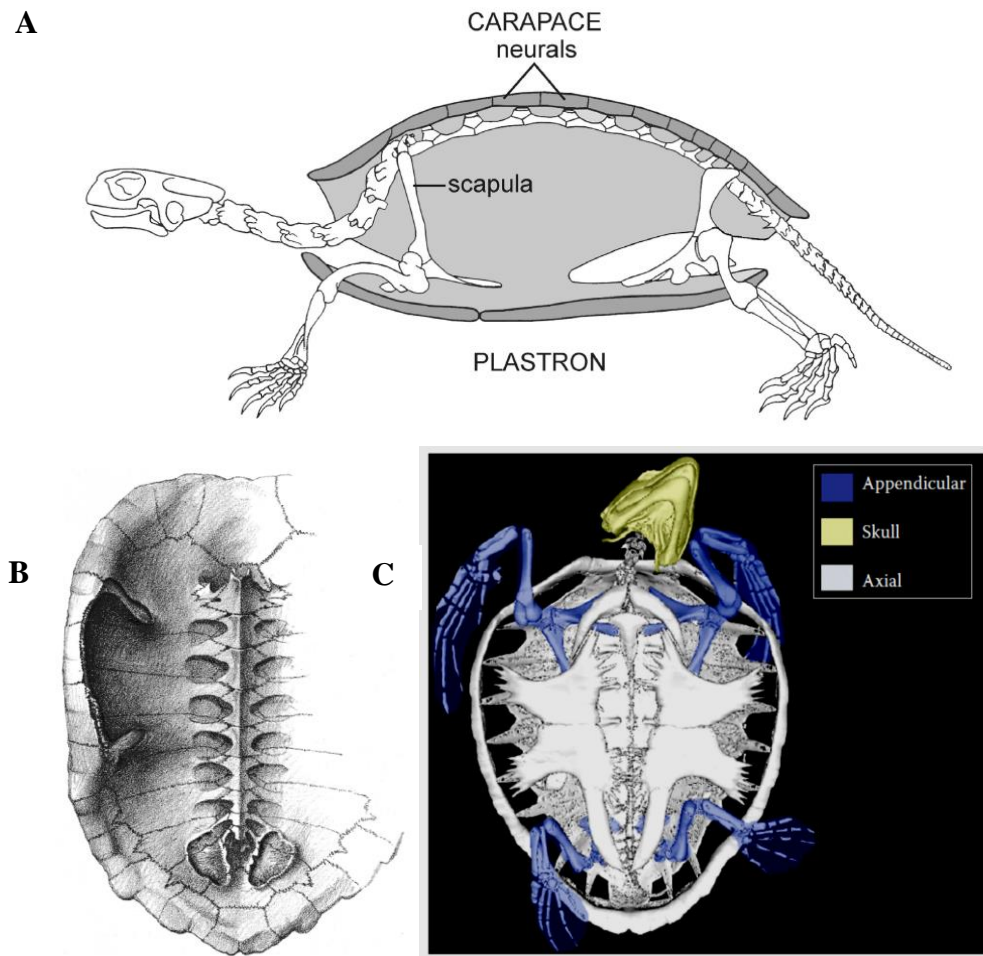
Fonte: modificada de THOMSON et al., 2021.

Com a diversificação dos primeiros quelônios, surgiu a linhagem Americhelydia (incluída na Subordem Cryptodira, CRAWFORD et al. 2015), formada por taxa que viveram no Período Cretáceo, na América do Norte. Existem três superfamílias naturais da Subordem Cryptodira, nomeadamente: Chelonioidea (tartarugas marinhas), Testudinoidea (tartarugas de água doce e cágados), e Trionychoidea (tartarugas de casco mole e semelhantes, inclui Kinosternoidea, grupo parafilético de tartarugas aquáticas). A Superfamília Chelonioidea é aquela na qual estão inclusas as tartarugas marinhas viventes, que colonizam os oceanos de forma cosmopolita (Figura 6, CRAWFORD et al. 2015).

O grupo das tartarugas marinhas viventes é descrito como monofilético (Figura 3, THOMSON et al., 2021), isto é, os indivíduos presentes nele partilham de um mesmo ancestral comum exclusivo. Considerando a linhagem das tartarugas marinhas (Chelonioidea), não é possível constatar de forma clara quando houve a separação entre esses grupos, uma vez que o registro mais antigo é datado de maneira presumida nas Américas (CRAWFORD et al. 2015).

A principal inovação evolutiva dos quelônios é a carapaça dorsal reduzida (chamada também de casco), sendo este um dos fatores que contribuíram para a diferenciação deste grupo, limitando sua diversidade. Além da presença do casco nestes quelônios, os dentes presentes nas regiões marginais da boca também fazem parte de sua morfologia característica, assim como o plastrão ventral, o qual apresenta clavículas e interclavículas (região anterior) e costelas localizadas no abdômen (região posterior) (Figura 4; WYNEKEN 2013; SCHOCH & SUES 2020). Tanto a carapaça, quanto o plastrão, estão formados por uma camada externa de queratina e uma camada interna composta de ossos, sendo, portanto, resultado da junção entre as costelas, vértebras e ossos dérmicos (HICKMAN et al. 2010; WANG et al. 2013; WYNEKEN 2013; CORDERO et al., 2018; EVERS & BENSON 2019; SCHOCH & SUES 2020).

**Figura 4** - Características morfológicas típicas da tartaruga.



Legenda: A, Casco, seção sagital através do esqueleto de um cágado-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*). B, Integração total do esqueleto axial dorsal na carapaça de um matamatá (*Chelus fimbriatus*), um cágado de água doce pertencente à família Chelidae. Carapaça mostrada em vista ventral (visceral). C, Visão ventral de uma tomografia computadorizada 3D de uma *Caretta caretta*, cabeçuda, juvenil. As três regiões do esqueleto são codificadas por cores. Observe que o ombro e os elementos do esqueleto pélvico estão dentro da caixa torácica, uma característica das tartarugas. Fonte: A e B, retirados de SCHOCH & SUES, 2020, C retirado de WYNEKEN, 2013.

As adaptações morfológicas presentes nas tartarugas marinhas mostram que durante sua evolução a carapaça se desenvolveu de tal modo a fornecer hidrodinâmica ao animal, ou seja, se tornando menos pesada e achatada, facilitando, portanto, o deslizamento entre as correntes de água. Além disso, as quatro patas evoluíram para nadadeiras, que permitiram uma maior facilidade e agilidade para natação (LUTZ & MUSIK, 1997; SANTOS et al. 2011). As glândulas de sal são outra das novidades evolutivas do grupo, são glândulas exócrinas cuja função é controlar o equilíbrio da concentração de sais no corpo do organismo, permitindo que as tartarugas bebam água salgada e se alimentem de plantas, ou animais, como invertebrados marinhos, com alta concentração iônica (PARRILLA-BELET al., 2016; de MELO et al. 2020).

### Histórico e espécies viventes

No mundo, existem sete espécies de tartarugas marinhas, habitando mar aberto e ambientes costeiros, e entre estas, há cinco espécies que se encontram no litoral brasileiro. Essas tartarugas pertencem à duas famílias: Cheloniidae, representada por *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) e *Lepidochelys olivacea* (Eschsholtz, 1829); e Dermochelyidae, com apenas uma espécie, *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761) (VARGAS et al. 2009; ALMEIDA et al. 2011; MARCOVALDI et al. 2011; CRAWFORD et al. 2015; ÁLVAREZ-VARAS et al. 2016).

### **Características gerais das tartarugas marinhas**

As tartarugas marinhas são muito conhecidas por viverem por muito tempo, podendo chegar aos 100 anos de vida ou mais. O principal motivo para esta longevidade é o fato de possuírem uma taxa metabólica reduzida. Esta condição também está ligada com sua respiração. É muito comum, observar-se nas praias esses animais colocando suas cabeças para fora por um período breve, e em seguida, ficar muito tempo de baixo da água. Isto se dá pelo fato das tartarugas marinhas consumirem uma quantidade muito baixa de oxigênio a cada segundo, fornecendo-lhes a capacidade de permanecer horas sem respirar (MOTANI, 2009).

Quando atingem a faixa etária de três a cinco anos, os indivíduos considerados juvenis se dirigem para áreas de alimentação dispostas ao longo da costa. Nestes locais, permanecem até que alcancem sua maturidade sexual, que para as tartarugas marinhas é em média 25 anos de idade (LUTZ & MUSIK, 1997). Chegando neste período, os indivíduos, tanto machos quanto fêmeas, migram para áreas de reprodução a fim de que ocorra o acasalamento. Geralmente, após um período reprodutivo, as fêmeas retornam para a praia em que nasceram, em um intervalo de dois a quatro anos, caracterizando a filopatria ("amor ao lar" em grego antigo, define o comportamento de animais que sempre retornam a locais específicos para se alimentarem ou procriarem) ((LUTZ & MUSIK, 1997; NARO-MACIEL et al. 2014; MARTINS et al., 2018). Pouco se sabe sobre o estágio de vida dos filhotes até que cheguem à fase de juvenis, chamados de anos perdidos ("lost years") (Figura 5).

**Figura 5** - Etapas do ciclo de vida das tartarugas marinhas.



Fonte: a autora, com imagens retiradas do Canva, 2022.

Não é novidade que este grupo realiza migrações de longas distâncias durante seu complexo ciclo de vida. Por este motivo, alguns espécimes com origem natal no litoral brasileiro são vistos em águas da África e do Caribe, consideradas muito distantes da América do Sul. Assim, a disponibilidade de recursos alimentícios e a localização dos sítios reprodutivos podem encontrar-se há longas distâncias oceânicas, e indivíduos que tenham nascido em uma mesma praia não necessariamente se alimentam nos mesmos sítios (ÁLVAREZ-VARAS et al. 2016; EVANS et al. 2019).

## Reprodução e paternidade múltipla

O acasalamento ocorre no ambiente marinho, em geral, próximo às áreas de desova. Fêmea e macho se encontram e a cópula começa com algumas mordidas no pescoço e nos ombros, podendo durar várias horas. Os machos e as fêmeas são muito semelhantes entre si, podendo ser diferenciados somente na fase adulta, quando os machos apresentam rabo longo e unhas bastante desenvolvidos. Os machos agarram-se às fêmeas, sobre o casco, utilizando as longas garras das nadadeiras anteriores e posteriores. Os machos brigam pela oportunidade da cópula, sendo comum que os ovos de uma mesma fêmea sejam fecundados por mais de um deles (paternidade múltipla). As tartarugas se desenvolvem a partir de ovos, a fêmea cava um buraco e põe os ovos dentro dele. Geralmente a temperatura do ninho tem influência no sexo dos filhotes, sendo que as temperaturas mais quentes favorecem o nascimento de fêmeas, ao passo que sob temperaturas mais frias nascem mais machos.

A caracterização genética de uma população reprodutiva de tartarugas marinhas pode ser obtida através de informações relacionadas sobre sua origem natal, ou seja, a partir de dados obtidos sobre seu local de nascimento. Características genéticas podem trazer conhecimento sobre indivíduos adultos de sítios reprodutivos distintos (REES et al., 2017).

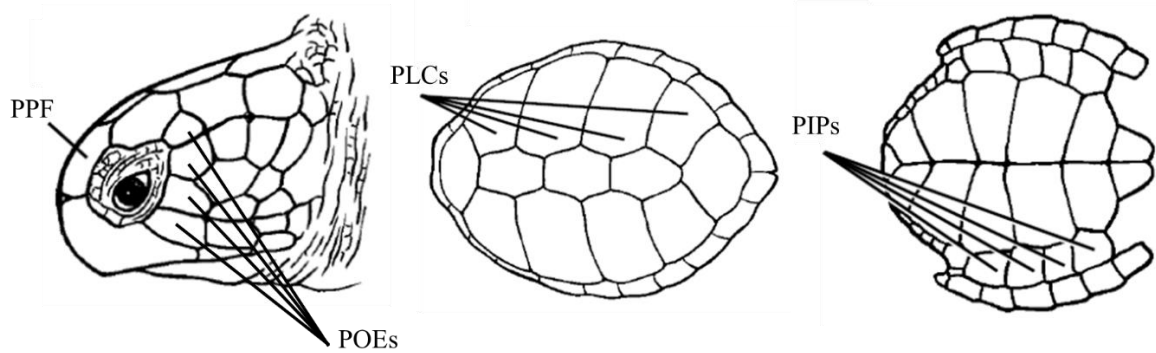
## ***Chelonia mydas***

### Aspectos morfológicos

Conhecida popularmente como tartaruga verde, *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758 (Testudines, Cheloniidae), recebeu tal denominação por apresentar a coloração esverdeada característica do tecido presente sob sua carapaça (AWABDI, 2013). Morfologicamente, possui um par de placas pré-frontais (PPFs) na cabeça, quatro placas orbitais (POEs) na lateral da cabeça (Figura 6), quatro pares de placas laterais (PLCs) na carapaça (Figura 7) e quatro pares de placas inframarginais no plastrão (PIPs) sem poros (SANTOS et al., 2011). Quando os indivíduos se tornam adultos, podem chegar ao comprimento total (linear) de 1,20 m, tendo um peso corporal de 230 kg (PRITCHARD & MORTIMER, 1999).



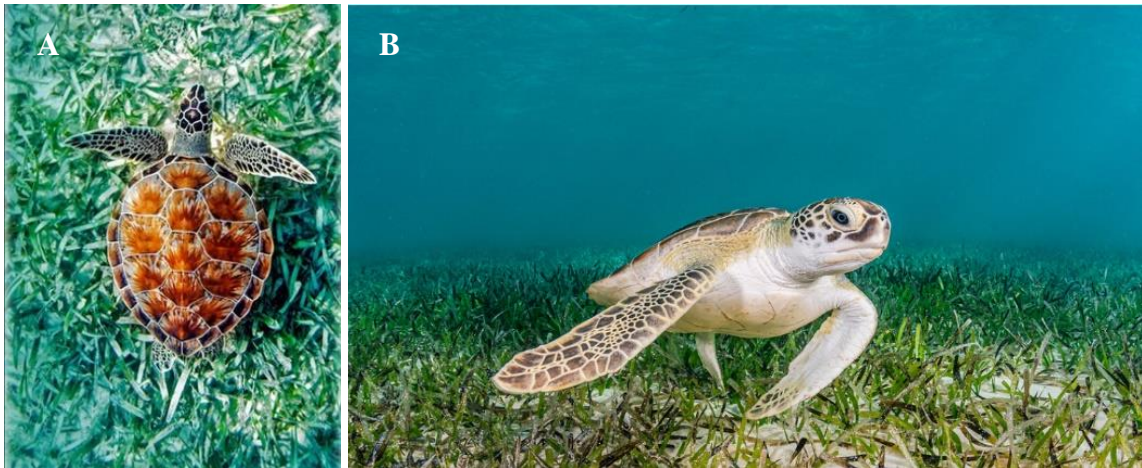
**Figura 6** - Placas de *Chelonia mydas*.



Legenda: PPF, placa pré-frontal; POEs, placas orbitais esquerda (quatro); POD, placas orbitais direita; PLCs, placas laterais da carapaça (quatro); e PIPs, placas inframarginais do plastrão (quatro pares). Fonte: modificada de WYNEKEN, 2001.

Sua dieta consiste em sua maior parte de “grama marinha”, chamada na literatura como *seagrass* (Figura 7). Usualmente, os indivíduos são encontrados durante o forrageamento sobre a superfície de um determinado substrato ou próximo ao mesmo (JOHNSON et al. 2017).

**Figura 7** - *Chelonia mydas* forrageando em gramas marinhas.

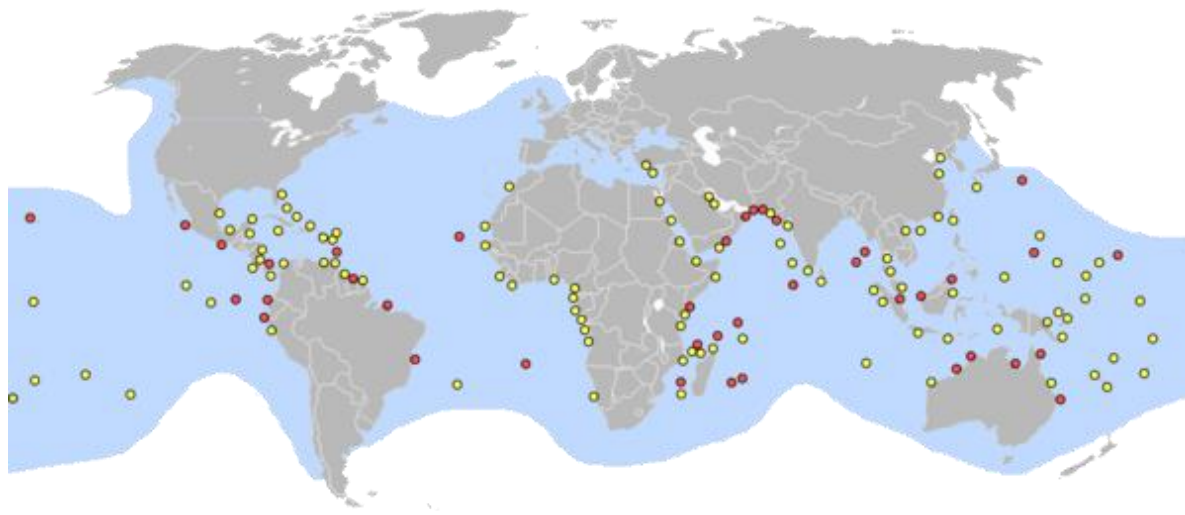


Legenda: A, Hawaii; B, Algas marinhas *Thalassia testudinum* Koenig, 1805, Bahamas.  
Fonte: A, <https://www.tripadvisor.com.br/LocationPhotoDirectLink-g28932-i297381766-Hawaii.html>; B, foto de Shane Gross, <https://grossphotographic.photoshelter.com/image/I0000ibq7Yt96PBc>.

### Distribuição geográfica da espécie e ocorrência no Brasil

É a espécie de tartaruga marinha que está localizada mais próxima da costa, sendo mais fácil sua visualização. Sua distribuição de forma cosmopolita entre os oceanos se dá em regiões tropicais e subtropicais (Figura 8). A Ilha da Trindade, o Atol das Rocas e a ilha de Fernando de Noronha, localizadas nos estados Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Pernambuco, respectivamente, são as regiões principais de ocorrência de desova da espécie (ALMEIDA et al., 2011; HAMABATA et al., 2020).

**Figura 8** - Distribuição de *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758 no globo.



Legenda: A faixa azul representa a distribuição, os círculos vermelhos são importantes locais de nidificação, e os círculos amarelos representam outros locais de nidificação menores.

Fonte: [https://www.inaturalist.org/guide\\_taxa/239573](https://www.inaturalist.org/guide_taxa/239573).

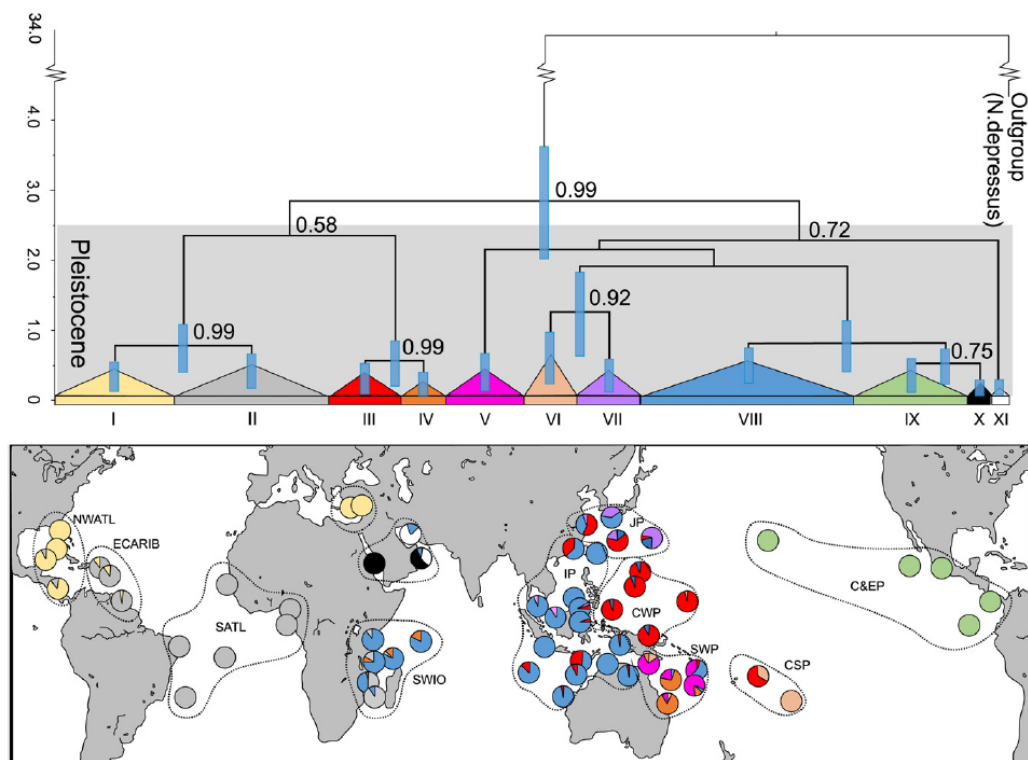
### Filogeografia global de *Chelonia mydas*

Em recente trabalho, Jensen e colaboradores (2019) examinaram a estrutura genética e a filogeografia global de *Chelonia mydas*, à luz de eventos climáticos do passado e das necessidades atuais de conservação. Usando uma análise filogeográfica para avaliar como a história demográfica, a dispersão e as barreiras ao fluxo gênico levaram à distribuição atual das linhagens de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>, 386 pares de bases da região controle), os autores



identificaram 11 linhagens divergentes vinculadas a regiões biogeográficas específicas (Figura 9). As análises filogenéticas revelaram uma origem antiga para as espécies centradas no Indo-Pacífico e colonização mais recente do Pacífico Central / Oriental, bem como a Bacia do Atlântico. No geral, existe uma forte estruturação genética, mas com um padrão claro de conectividade regional entre colônias. As principais conclusões foram que as flutuações climáticas do passado afetaram muito a distribuição da diversidade genética da tartaruga verde (altamente migratória), influenciaram as populações locais de maneiras diferentes (filopatria), e as espécies parecem ter sobrevivido às últimas glaciações em múltiplos refúgios glaciais.

**Figura 9** - Árvore filogenética bayesiana inferida da região controle mitocondrial (384 pares de bases, bp) de tartarugas verdes, *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758.



Legenda: Os números acima dos ramos correspondem às probabilidades posteriores calculadas no BEAST. O eixo dos comprimentos dos ramos é dado em milhões de anos. Barras azuis verticais denotam os valores de intervalos de densidade posterior 95% mais altos estimados para os nós da árvore. *Natator depressus* foi o grupo externo para esta análise. O mapa mostra as proporções de ancestralidade da população de cada uma das 11 linhagens de DNA mitocondrial da tartaruga verde (I – XI). Os gráficos de pizza no mapa indicam a proporção relativa de indivíduos de cada Unidade de Manejo que pertencem a cada linhagem, com cada cor correspondendo a uma linhagem genética. As principais regiões evolutivamente distintas (agrupadas por linhas tracejadas no mapa) são NWATL = Atlântico NW, ECARIB = Caribe Oriental, MED = Mediterrâneo, SATL = Atlântico Sul, SWIO = Oceano Índico SW, NWIO = Oceano Índico NW, IP = Indo-Pacífico, JP = Japão, CWP = Pacífico Centro-Oeste, SWP = Pacífico Sudoeste, CSP = Pacífico Sul Central e C&EP = Pacífico Central e Oriental. Fonte: retirada de JENSEN et al., 2019.

## Histórico e principais ameaças

As tartarugas marinhas, de uma maneira geral, sempre sofreram com o impacto negativo provocado pelo ser humano. A exploração comercial de certas partes do corpo destes animais, como seu casco (ou carapaça), sua carne e ovos, juntamente com a poluição do ambiente marinho (como o lixo jogado nas praias) e a perda do habitat causada pelo desenvolvimento costeiro, foram outros fatores que contribuíram para a redução do número de indivíduos e para o atual estado de conservação das espécies (ALMEIDA et al. 2011; CASTILHOS et al. 2011; MARCOVALDI et al. 2011; SANTOS et al. 2011).

Em resposta a estas ameaças, a espécie analisada aqui encontra-se, de acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN, 2021) e com a lista nacional do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio 2018; SiBBR 2021), dentro das categorias “EN, ‘*endangered*’ – em perigo” e “VU, vulnerável”, respectivamente (Figura 10).

**Figura 10.** Estado de conservação de *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758.

The screenshot displays the IUCN Red List and SiBBR (Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção) entry for *Chelonia mydas* (Green Turtle). The page includes a large image of the turtle, its scientific name, and its conservation status. The IUCN status is VU (Vulnerable), and the SiBBR status is EN (Endangered). A map of Brazil shows the distribution of the species, with 310 recorded occurrences marked as red dots along the coast. The page also features a search bar, navigation tabs, and a list of online resources.

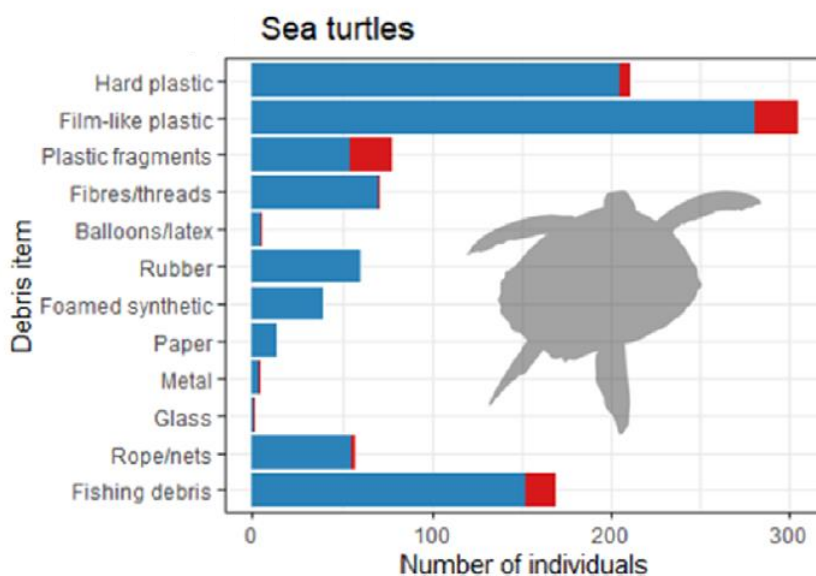
Fontes: <https://www.iucnredlist.org/search?query=Chelonia%20mydas&searchType=species> e <https://specieslist.sibbr.gov.br/speciesListItem/list/drt1572557301581?q=Chelonia+mydas>.

Dentre as principais ameaças para esta espécie, estão a captura não intencional por meio de diferentes tipos de artefatos de pesca, a perda de habitat, a poluição dos oceanos, o acometimento de doenças e as mudanças climáticas (NARO-MACIEL et al. 2014; TRUSCOTT et al. 2017; SINAIEI et al. 2021).

### Resíduos sólidos

O crescente avanço dos centros urbanos, do ramo industrial e da tecnologia tem um benefício imenso tanto para a humanidade, quanto para conservação e preservação da biodiversidade, porém, este desenvolvimento também gera produção de resíduos sólidos. Estes resíduos, por sua vez, provocam uma elevação no nível de poluição, na produção de nutrientes e partículas em suspensão e sedimentação no ambiente marinho (BELL et al. 2019; ROMAN et al. 2021) (Figura 11).

**Figura 11** - Itens de resíduos sólidos (lixo) comidos e letais para tartarugas marinhas na necropsia.

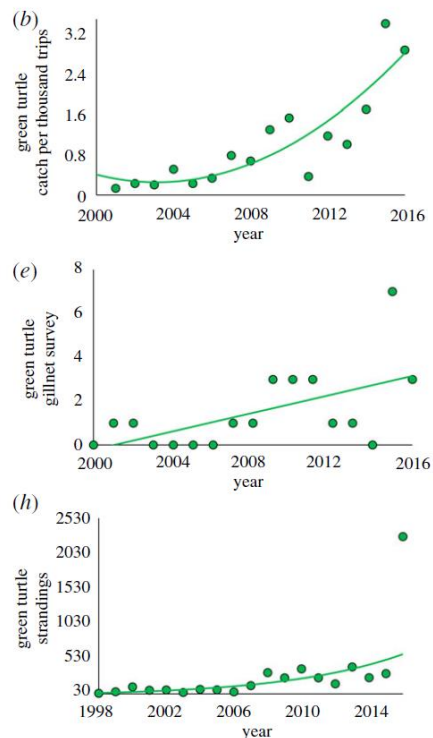


Legenda: Resumo da ingestão de detritos em estudos de tartarugas marinhas onde a causa da morte era conhecida. Os itens de detritos específicos que causam a morte são mostrados em vermelho, enquanto os itens de detritos presentes no trato gastrointestinal, mas que não são responsáveis pela mortalidade, são mostrados em azul. Fonte: Retirado de ROMAN et al., 2021.

## Pesca incidental

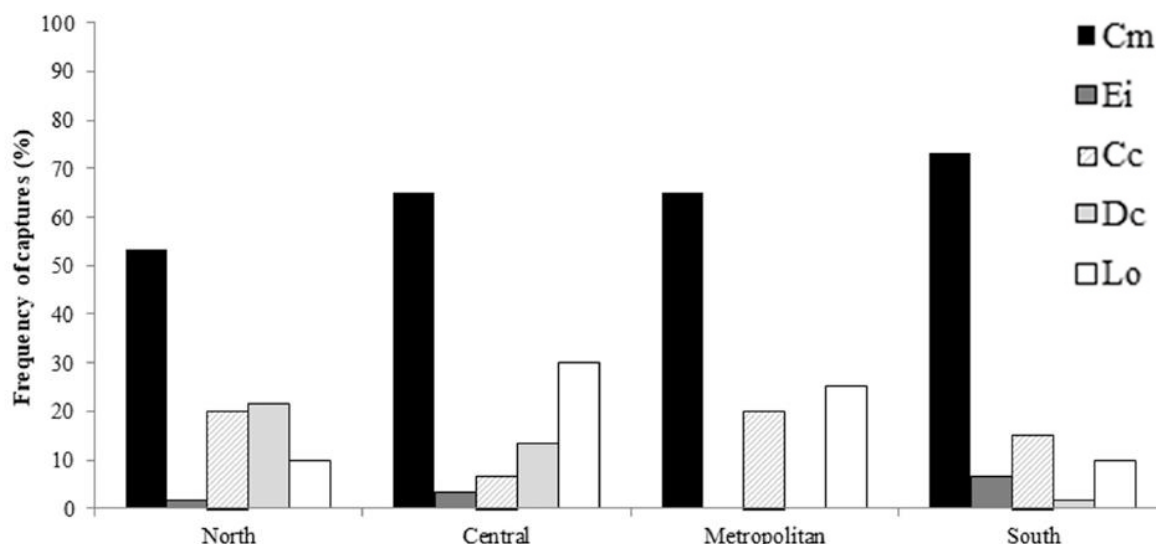
Devido ao elevado número de redes de pesca de emalhe, arrasto de camarão, linha e anzol, *Chelonia mydas* possui a taxa mais alta de espécimes (PUTMAN et al. 2020; AWABDI et al. 2021) em fase juvenil capturados e mortos por este tipo de artefatos de pesca (Figura 12 e 13). Vale ressaltar que o resultado de um maior índice de indivíduos juvenis capturados pela pesca, pode ser pelo fato de que são animais menores e, por isto, são mais susceptíveis de ficarem presos (CHALOUPKA et al. 2008; AWABDI 2013). A perda de uma nadadeira, uma das consequências acarretadas pelas redes, pode desencadear um outro problema grave para a tartaruga: afetar a habilidade de forragear, visto que o animal não consegue manter sua flutuabilidade e, também, nada com dificuldade (DE MELLO & ALVAREZ, 2020).

**Figura 12** - Tendências na captura acidental da pesca com rede de emalhe e índices de abundância de tartarugas marinhas nas águas da Carolina do Norte.



Legenda: Tendências estatisticamente significativas são mostradas com linhas sólidas, linhas tracejadas denotam nenhuma tendência detectável ao longo do tempo. (b) As taxas de captura acidental da tartaruga verde aumentaram acentuadamente (ajuste quadrático,  $R^2 = 0,770$ ,  $p = 0,000072$ ,  $n = 16$ ). (e) No levantamento com redes de emalhe independentes da pesca, o número de tartarugas capturadas a cada ano aumentou para as tartarugas verdes (ajuste linear  $R^2 = 0,33$ ,  $p = 0,015$ ,  $n = 17$ ). (h) Encalhes em todo o estado aumentaram para as tartarugas verdes (ajuste quadrático  $R^2 = 0,478$ ,  $p = 0,00552$ ,  $n = 19$ ) Fonte: Retirado de PUTMAN et al., 2020.

**Figura 13** - Frequência de captura acidental de espécies de tartarugas marinhas no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, de acordo com relatos de pescadores.



Legenda: Cm = *Chelonia mydas*, Ei = *Eretmochelys imbricata*, Cc = *Caretta caretta*, Dc = *Dermochelys coriacea*; e Lo = *Lepidochelys olivacea*. Fonte: Retirado de AWABDI et al., 2021.

### Doenças e poluição

Diversos agentes acarretam enfermidades nas tartarugas verdes, entre eles os agentes virais, bacterianos, parasitários e fúngicos (BINDACO et al. 2020, GLEASON et al. 2020, MASHKOUR et al. 2020, RAO et al. 2020, RITTENBURG et al. 2021). A proliferação destes patógenos no ambiente marinho muitas vezes é aumentada ou até causada por efeitos colaterais como resposta à poluição, como acredita-se ser o caso, por exemplo, do herpesvírus (HV) associado à fibropapilomatose (RAO et al. 2020). Ao contrário do que a maior parte dos estudos trata, outras variantes de HV também causam doenças nas tartarugas verdes, como o ChHV-1 e o ChHV-6, os quais provocam dermatite, conjuntivite, traqueíte, entre outros sinais clínicos (BINDACO et al. 2020). Efeitos como redução da proteção ao organismo fornecida pelo sistema imune, elevação do potencial de causar doença e habilidade de ressurgência de infecção, também são possíveis consequências que agentes poluentes podem desencadear (DA SILVA et al. 2016).

## **A importância da educação ambiental**

O desenvolvimento de medidas corretas e efetivas de manejo, monitoramento e conservação junto da intensa educação ambiental da população humana é de fundamental importância para manutenção das espécies de tartarugas marinhas. No estudo publicado por Rees e colaboradores, em 2016, buscou-se responder vinte metaquestões a respeito de ações de conservação, metodologias de manejo, doenças, origem natal, impactos antropogênicos, mudanças climáticas, dinâmica populacional, reprodução e biogeografia. Foram obtidos resultados muito interessantes e intrigantes, entre eles a baixíssima quantidade de material disponível na literatura científica a respeito de reprodução, conservação (caracterização de ameaças e medidas) e sobre a influência dos impactos antropogênicos nas populações de tartarugas marinhas. Isto alerta para o fato de que os esforços para explicar o assunto tratado neste tópico são carentes de dados e, portanto, necessitam de continuidade.

A fim de que estas ações integradas funcionem, diversas questões devem ser levadas em conta, como conhecer a comunidade local, a biologia da espécie-alvo e de que maneira aplicar as ações pensadas. Isto porque, entendendo-se como as relações entre as partes funcionam (comunidade, espécie-alvo, economia, de que forma a população/governo local pode proteger, etc.) todos sairão ganhando. Por exemplo, propor um trabalho que seja lucrativo para o produtor e que ao mesmo tempo faça produtor e consumidor estarem cientes do porquê e de como agir na conservação do ambiente marinho e suas tartarugas. O incentivo governamental é imprescindível para que tudo seja realmente bem encaminhado (DELISLE et al. 2018; GODLEY et al. 2020).

Há diversos projetos de conservação que podem servir de exemplo, como o Projeto TAMAR (<https://www.tamar.org.br>), que realiza confecções de produtos da marca do projeto, que são produzidos pela comunidade local. Um outro é o Projeto Iurukuá (@projetoiturukua), criado por uma aluna e seu orientador (RÊGO et al. 2021) no campus NUPEM-UFRJ, que no momento, além de ações nas redes sociais (divulgação de conteúdo sobre a tartaruga marinha), também promove a venda de rifas em prol de confeccionar tendas, mascotes, informes para atender mais e tornar mais visível suas ações e porque a tartaruga marinha merece atenção. Já o Projeto Aruanã (@projetoaruana) está consolidado no apoio a conservação das tartarugas marinhas residentes próximas a colônia de pescadores de Itaipu, Niterói, R.J.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

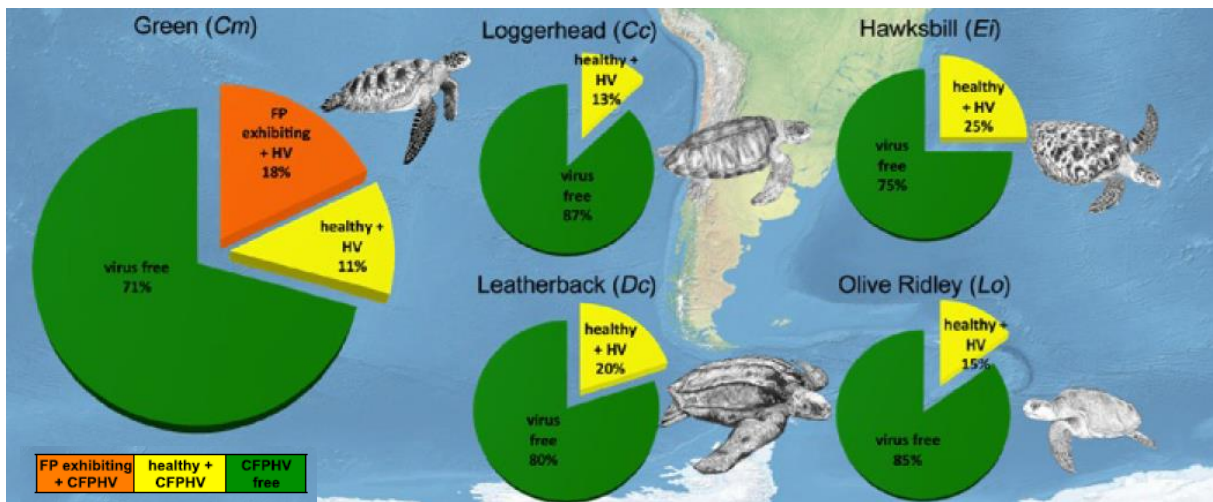
### 1.1 O herpesvírus e a fibropapilomatose

#### 1.1.1 O que é a fibropapilomatose?

As tartarugas marinhas, assim como outros animais, plantas e seres humanos, são acometidas por uma série de doenças e, entre elas, está a fibropapilomatose, chamada aqui como “FP”. Estudos informam que a FP é uma doença contagiosa, que está relacionada aos herpesvírus, os quais pertencem à Família Hesperviridae, que se caracteriza por ser dividida em três subfamílias e 13 gêneros. O herpesvírus 5 de quelônios (ChHV5), um vírus de DNA (ÁLVARES-VARAZ et al., 2019), é constantemente apresentado como o agente causador (agente etiológico) da FP, visto que ele foi visualizado em amostras de tumor. Este vírus pertence à subfamília *Alpha-*, sendo chamado, portanto, de *alpha*-herpesvírus. É reportado que o grupo de vírus em questão evoluiu juntamente com seu hospedeiro, tornando-o hospedeiro-específico (PAGE-KARJAN et al., 2012; LAWRENCE et al., 2018; JAMES et al., 2020, 2021).

A FP em tartarugas marinhas resulta na produção de tumores, tanto externos quanto internos (ou seja, viscerais), que são considerados benignos, mas podem obstruir funções cruciais, como natação, alimentação, visão e flutuabilidade, e pode levar à morte. A fibropapilomatose de tartarugas marinhas foi relatada pela primeira vez na década de 1930 em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em Key West, Flórida, EUA (SMITH e COATES, 1938). Atualmente, a FP, em *C. mydas*, outras tartarugas marinhas, e outros hospedeiros, tem uma distribuição circuntropical (AGUIRRE e LUTZ, 2004; ALFARO-NÚÑEZ et al. 2014) (Figura 14), e foi relatada em todas as grandes bacias oceânicas nas quais tartarugas marinhas são encontradas, particularmente em habitats próximos à costa.

**Figura 14** - Detecção global de Herpesvírus associado ao Fibropapiloma de quelonídeo (CFPHV).



Legenda: Porcentagem de infectividade de tartarugas CFPHV agrupadas por diferentes espécies de tartarugas. As cores diferentes representam a categoria da amostra de tecido e o status de infectividade como segue; Laranja = FP exibindo tartarugas com CFPHV positivo, Amarelo = tartarugas clinicamente saudáveis também CFPHV positivo e Verde = tartarugas clinicamente saudáveis CFPHV negativo (sem CFPHV). Fonte: Retirado de ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014.

### 1.1.2 Manifestação clínica

A manifestação clínica da fibropapilomatose ocorre por meio de tumores cutâneos neoplásicos geralmente benignos que podem apresentar superfície lisa ou rugosa. Estes podem aparecer como papilomas, fibropapilomas, fibromas, fibrosarcomas e mixofibromas. Os papilomas emergem no tecido epidermal podendo ou não atingir a derme. Os chamados de fibropapilomas são caracterizados por apresentar hiperplasia em ambas as camadas citadas anteriormente, derme e epiderme, afetando principalmente a região dos olhos, boca e pescoço do animal (Figura 15). Os fibromas, fibrosarcomas e mixofibromas são descritos como tumores viscerais. No caso dos fibromas, que afetam órgãos internos, a característica das lesões é dérmica, podendo-se observar tecido epidérmico sem alteração. Estes acometem trato gastrointestinal, via respiratória (laringe, faringe, esôfago e pulmões), cavidade oral, coração, rins, fígado, baço e músculos esqueléticos (RODENBUSH et al., 2012; ROSSI et al., 2021).



Em casos graves, as lesões causadas pela FP podem provocar dificuldade durante natação, forrageamento, respiração, etc. Além destes sinais clínicos, infecções oportunistas, bacteremia e anemia são frequentemente observadas em animais com FP. Isto porque, conforme as lesões tumorais vão se expandindo, os locais afetados conseqüentemente ficam mais sensíveis e tornam-se susceptíveis a proliferação de bactérias, as quais favorecem ainda mais a permanência e desenvolvimento da FP (BLACKBURN et al. 2021). Já ao se tratar das hemácias (as células vermelhas do sangue), os indivíduos acometidos pela FP têm seu nível reduzido (DE MELLO & ALVAREZ, 2020).

Similar ao herpesvírus do papiloma humano, o ChHV5 também permanece latente durante toda a vida do animal infectado. Desta forma, pode manifestar-se em animais doentes mas em tecido saudável dependendo do estágio e nos momentos em que o sistema imunológico está fragilizado por algum tipo de situação de estresse do indivíduo, como por exemplo uma alteração climática drástica (HERBST, 1994; PAGE-KARJAN et al., 2012, 2020; PATRÍCIO et al., 2012). Outro fator que deve ser levado em conta com relação à transmissão é que o vírus pode permanecer vivo, ativo na água por longos períodos, de horas a dias (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; LAWRENCE et al., 2018).

**Figura 15** - Fibropapilomas nas tartarugas marinhas de Angra dos Reis (R.J.).



Legenda: (a) Tumores localizados na base do pescoço; (b) Tumores localizados na base da nadadeira frontal do lado direito, animal MT036, (c) Tumores localizados na base das quatro nadadeiras e no pescoço.  
Fonte: PROMONTAR-ANGRA, 2013.

### 1.1.3 Grupo-alvo e disseminação da doença

A FP é uma doença que acomete todas as espécies de tartarugas marinhas, sendo que a maior taxa de prevalência dos casos é vista nas tartarugas verdes (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014). Dependendo dos casos em uma determinada localidade, alguns autores chamam o vírus de epizootico (do grego: epi- sobre + zoon- animal, um evento de doença em uma população de animais análogo a uma epidemia em humanos), e outros o caracterizam como panzootico. Uma epizootia pode ser restrita a um local específico (um surto), diversos locais (geral ou epizootica) ou generalizada (panzootica). A alta densidade populacional é um importante fator que contribui para as epizootias. Os indivíduos juvenis são os mais afetados (ENE et al., 2005), visto que quando atingem um tamanho médio e se tornam sexualmente maduros, esta taxa cai. Sugere-se que o período de transmissão ocorre neste estágio de vida pelo fato de que é o momento no qual são recrutados para o ambiente nerítico (ENE et al., 2005). Além disso, como já citado anteriormente, as tartarugas marinhas realizam constantes migrações ao longo de suas vidas, e isto pode interferir na disseminação da FP, devido à transmissão horizontal (JONES et al., 2020). Por este motivo, a enfermidade exige maior cautela no manejo em animais de cativeiro/reabilitação, eles precisam ficar em quarentena para verificar se estão contaminados. Devido a latência do vírus, a população considerada saudável de uma localidade, em regiões de forrageamento ou de nidificação, pode vir a ter indivíduos portando o vírus sem manifestação clínica (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; PAGE-KARJAN et al., 2020; JAMES et al., 2021).

A presença de sanguessugas do gênero *Ozobranchus* Quatrefages, 1852 é registrada constantemente nas lesões provocadas pela FP. Acredita-se que os ectoparasitas deste gênero desenvolvem um papel na etiologia da doença, provavelmente se aproveitando da alta vascularização dos tumores, transmitindo partículas virais de ChHV5 e tornando o indivíduo mais susceptível a desenvolver a FP (NIGRELLI e SMITH, 1943; EHRHART, 1991; RITTEMBURG et al. 2021). As espécies *O. branchiatus* (Menzies, 1791) e *O. margoi* (Apáthy, 1890) foram observadas no estudo de Rittemburg e colaboradores (2021) em indivíduos acometidos e não acometidos, sendo a maior prevalência nos indivíduos positivos. O estudo analisou *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* e foi constatado que a primeira espécie apresentou maior abundância das sanguessugas, 43.7% e 33.7%, respectivamente. Além disso, foi identificado que 27.5% das sanguessugas analisadas de tartarugas infectadas, também possuíam o vírus, o que confirma a transmissão para o ectoparasita.

#### 1.1.4 Os impactos ambientais e a incidência da FP

Estudos apontam que há uma forte relação entre os impactos ambientais negativos antropogênicos e a incidência de fibropapilomatose em determinadas regiões. Entre estes impactos estão o desenvolvimento costeiro, os altos níveis de poluição, agricultura, elevada concentração da população humana, etc. O sistema de defesa do organismo é regido por substâncias específicas, as quais acabam elevando a taxa de contágio e/ou pronunciamento da FP em decorrência dos fatores mencionados (PATRÍCIO et al, 2012; JAMES et al., 2021). O consumo de macroalgas não-nativas (que podem dominar águas ricas em nutrientes e sequestrar o N ambiental no aminoácido arginina) está entre um dos agentes que interferem no nível de incidência da FP. A arginina é conhecida por regular a atividade imunológica, promover a multiplicação do herpesvírus e contribuir para a formação de tumor (Van HOUTAN et al. 2010).

Outros estudos com tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) indicam uma associação positiva entre o desenvolvimento da neoplasia e a poluição do oceano (ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010, 2011; Van HOUTAN et al., 2014; BAINES et al., 2021). Por exemplo, Dos Santos e colaboradores (2010) usaram um índice ecológico para determinar a qualidade da água em uma área e encontraram um aumento nos fibropapilomas, de 0% em águas limpas, para 58,8%, em locais poluídos. Além disso, como o desenvolvimento de neoplasia é frequentemente um problema multifatorial, é possível que a poluição aquática possa estar trabalhando em conjunto com a etiologia viral, resultando em aumento da prevalência de neoplasia (UJVARI et al., 2017).

No estudo feito por Da Silva e colaboradores (2016), a presença dos metais pesados cobre (Cu), ferro (Fe) e chumbo (Pb) foi observada tanto em animais saudáveis, como em indivíduos afetados pela FP, sendo que nestes últimos, a concentração dos metais foi claramente maior. Estes elementos podem se acumular em gramas marinhas e algas, por exemplo, itens alimentares muito ingeridos pelas tartarugas verdes, o que torna este meio de transmissão o mais provável. Após a caracterização da FP como panzoótica (generalizada), surgiram mais evidências de que as condições ambientais e/ou ecológicas interferem em seu desenvolvimento (ROSSI et al, 2021).

## 1.2 Abordagens moleculares no estudo da relação herpesvírus-tartaruga

O crescente avanço da ciência nas técnicas moleculares (principalmente a reação em cadeia da polimerase – PCR e o sequenciamento de nova geração ou em larga escala) geraram novas descobertas sobre a história de vida das tartarugas marinhas. Há duas décadas houve um grande avanço nos estudos sobre o uso de habitat, filopatria, comportamento de acasalamento, padrões migratórios, número de indivíduos contribuintes geneticamente em uma população, contribuições paternas e relações de parentesco por ninho, sucesso reprodutivo, endocruzamento, hibridização, viabilidade populacional e suscetibilidade a alterações ambientais (FORMIA, 2002; STEWART & DUTTON, 2011; DUTTON & STEWART, 2013; GONZÁLEZ-GARZA et al., 2015; TEDESCHI et al., 2015; FIGGENER et al., 2016; JOSEPH et al., 2017; SARI et al., 2017; GAOS et al., 2018).

O herpesvírus quelonídeo pode ser detectado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seja ela convencional ou em tempo real (RT-PCR) (QUAKENBUSH et al., 1998, 2001; RODENBUSH et al., 2012). Vários estudos usaram abordagens moleculares clássicas para detectar o DNA do ChHV5 via reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de tumor de tartarugas afetadas com FP. A replicação dos vírus ChHV5 é comum em tecidos que apresentam tumores, pois existem grandes concentrações de partículas virais. Assim, a expressão de ChHV5 nestas tartarugas é previsível. No entanto, durante infecções latentes, as concentrações de partículas virais são muito baixas, apresentando um desafio para detectar o vírus (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2016; PATRÍCIO et al., 2016).

O genoma completo de ChHV5 foi sequenciado usando sequências derivadas de cromossomo artificial bacteriano (BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*) (ACKERMANN et al., 2012). Os ensaios de PCR para detecção do herpesvírus quelonídeo utilizam primers para a amplificação de diversas regiões altamente conservadas do gene ChHV5, como o gene UL18 da proteína de capsídeo, o gene UL22 da glicoproteína H, o gene UL27 da glicoproteína B (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014) e o gene UL30 da subunidade catalítica da DNA polimerase (DNAPol) (LU et al., 2000). Embora um estudo anterior de Alfaro-Nunez & Gilbert (2014) concluiu que é muito improvável que a PCR resulte positiva se um único gene for usado para rastrear a presença do vírus, neste trabalho utilizamos apenas o gene UL30 da DNAPol, por ter sido considerado sensível em um estudo anterior (ALFARO-NÚÑEZ et al. 2014).

A variação genética do vírus ChHV5 é um campo emergente, já foram descritos quatro clados/linhagens distintos de vírus (A, B, C e D), dois dos quais (A e C) estão presentes em

várias espécies de tartarugas distribuídas globalmente no Pacífico Oriental, Atlântico Ocidental e Caribe Oriental, Pacífico Centro-Oeste e Atlântico (ENE et al. 2005; PATRICIO et al. 2012). Neste trabalho, buscamos as sequências do vírus ChHV5 depositadas no GenBank® (banco de dados de sequências genéticas do *National Institutes of Health* - NIH, uma coleção anotada de todas as sequências de DNA disponíveis publicamente), e enumeramos as sequências oriundas do Atlântico com a letra B (a ordem foi dada pelo alinhamento das sequências de B1 a B14).

Amostras coletadas de tartarugas de uma determinada região tendem a se agrupar no grupo filogeográfico associado. Por exemplo, amostras do Brasil se concentram no Atlântico (RODENBUSH et al., 2014), e amostras do Equador, no Pacífico (CÁRDENAS et al. 2018). A variação no ChHV5 também foi descrita em níveis mais locais, com quatro variantes na Flórida (ENE et al. 2005) e cinco (B1, B2, B7, B8 e B9, RODENBUSH et al., 2014), duas (B7 e B8, MONEZI et al. 2016) e quatro (A, B7, B8 e B10, DOMICIANO et al. 2019) variantes no Brasil. Uma influência geográfica na distribuição dessas variantes foi relatada no Brasil (RODENBUSH et al., 2014), Flórida (ENE et al. 2005), Havaí (HERBST et al., 2004) e na Austrália (ARIEL et al. 2017). Caracteristicamente, as tartarugas em um local de forrageamento específico são infectadas com a mesma variante viral, que é distinta das variantes encontradas em outros locais de forrageamento dentro de uma determinada região (HERBST et al., 2004; ENE et al. 2005; GREENBLATT et al., 2005b; PATRICIO et al. 2012; RODENBUSH et al., 2014; ARIEL et al. 2017).

### 1.2.1 Filogeografia do vírus

Sugere-se que há cerca de 8,9 milhões de anos ocorreu a coevolução do agente etiológico da FP, o vírus ChHV5, e o seu hospedeiro, a tartaruga marinha. Isto indica que houve uma coadaptação entre eles, que resultou em uma relação específica entre o vírus e a tartaruga (HERBST et al. 2004; ÁLFARO-NÚÑEZ et al., 2014). Álfaro-Núñez e colaboradores (2014) apontam que a propagação da FP como epizootica em diferentes pontos do globo não foi uma consequência desencadeada como resposta ao fator de virulência apresentado pelas mutações virais, já que as mutações não atuavam de maneira independente entre uma linhagem viral e outra (ÁLFARO-NÚÑEZ et al., 2014), mas sim em conjunto. Análises filogenéticas inferidas com os genes UL18, UL22, UL27 e sequências do gene UL30, indicam que o ChHV5 sofreu coevolução região-geográfica-específica por meio da associação com a tartaruga (LOGANATHAN et al., 2021).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

A dissertação objetiva examinar as variantes virais do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5) associadas aos fibropapilomas de tartarugas presentes em tumores e em tecido saudável, na área de alimentação da região de Angra dos Reis (R.J.), no período de 2013 a 2016.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estimar a prevalência da fibropapilomatose em tartarugas-verdes da área de alimentação da região de Angra dos Reis (R.J.), no período de 2013 a 2016;
- Identificar e relacionar as variantes do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5) encontradas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem

Todo o material analisado foi coletado nos anos de 2013, 2014, 2015 e 2016 por membros do PROMONTAR (Programa de Monitoramento de Tartarugas Marinhas), em Angra dos Reis e Paraty, ambas localizações situadas no Estado do Rio de Janeiro. Tartarugas vivas (mergulho de captura intencional) e mortas/doentes (rede de resgate de encalhes) foram analisadas. As áreas escolhidas para captura intencional por mergulho foram o Efluente das Usinas (Piraquara), Praia Vermelha e Ilha do Pelado, sendo a primeira a área de estudo; a segunda, o controle 1 (próximo do Efluente); e a terceira, o controle 2 (distante do Efluente) (Figura 16). Foram analisadas amostras de tecido epidermal e tecido tumoral. Juntamente a essas amostras foram obtidas informações sobre espécie, data (dia, mês e ano de coleta), horário, local de coleta, comprimento curvilíneo de carapaça (CCC), largura curvilínea de carapaça (LCC) (medidas com fita métrica em centímetros), peso (medido com balança de mão, em gramas), presença ou não de papiloma, número de placas na cabeça, condição corpórea (robusta, intermediária e ruim), coleta ou não de sangue, glicemia, temperatura da água, temperatura da tartaruga (medida com termômetro, na cloaca), marcas colocadas, encontradas e retiradas, e outras observações, como escore de severidade da fibropapilomatose (as tartarugas receberam um escore de gravidade do fibropapiloma (FPS) em uma escala de 0-4: FPS = 4, o caso mais grave; FPS = 3, fortemente afetado; FPS = 2, moderadamente afetado; FPS = 1, levemente afetado, como descrito por WORK e BALAZS, 1999; e AGUIRRE e BALAZS, 2000). Após anotação de todos os dados, no caso dos animais vivos e saudáveis, estes foram devolvidos ao mar. No Anexo B, encontram-se as Autorizações para atividades com finalidade científica, obtidas no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

**Figura 16** - Área coberta pelos mergulhos de captura incidental.



Legenda: pontos de coleta: i) área de estudo, Efluente da Usina Nuclear, com temperatura alta da água de resfriamento dos reatores (Piraquara); ii) controle 1, perto (Praia Vermelha); iii) controle 2, longe (Ilha do Pelado). A seta vermelha indica a posição das Usinas Nucleares.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.2 Extração de DNA total de amostras de tartarugas marinhas

A extração foi feita de acordo com o protocolo de extração de DNA genômico com tampão de lise contendo 2% de CTAB, modificado de Damato & Corach (1996). O tampão de lise é composto por 2% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) + 100 mM Tris-Cl pH 8,0 + 20 mM EDTA + 1,4 M NaCl. O tampão de lise é adicionado em cada amostra e colocado em banho maria, a 37°C, *overnight*.

Após esta etapa, ocorreu a maceração do tecido das amostras e, então, foi adicionado igual volume de clorofórmio (500 µL) gelado, a fim de que extrair as proteínas, gorduras e grandes *debris* celulares. Após centrifugação, a fase aquosa, contendo o DNA, foi transferida para um tubo limpo, e foi adicionado um volume de isopropanol (500 µL) e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M (50 µL) gelados. A suspensão foi homogeneizada por inversão, centrifugada, o precipitado resultante foi colocado em estufa para secar completamente, e armazenado no freezer a -20°C *overnight*. Para suspender o DNA, 20 µL de RNase diluída foram adicionados nas amostras, as quais posteriormente foram armazenadas em temperatura



ambiente *overnight*. A quantificação foi feita em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo e utilizando o aparelho Nanodrop™ (Thermo Scientific). A visualização em gel de agarose é uma análise qualitativa, permitindo determinar se houve degradação ou contaminação das amostras.

### 3.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os primers utilizados nas amplificações foram o GTHV2-senso (5'-GACACGCAGGCCAAAAAGCGA-3') e o GTHV3-antisenso (5'-AGCATCATCCAGGCCCAACAA-3'), que amplificam um fragmento de 483 pb do gene da DNA polimerase (DNApol) do genoma viral (QUACKENBUSH et al. 1998). As condições nas quais realizaram-se as mesmas foram: 18,5 µL de H<sub>2</sub>O, 6 µL de GoTaq (5 mM) Buffer, 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de dNTP (2 mM), 0,6 µL de primer GTHV2 e primer GTHV3 (ambos na concentração estoque de 5 mM), 0,1 µL de GoTaq (5 mM) e, por fim, 1 µL de DNA de cada amostra, resultando em um volume final de 30 µL. No termociclador Verity (Life Technology), o programa foi: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C (30 segundos), pareamento dos primers a 62°C (30 segundos) e polimerização pela DNA polimerase a 72°C (30 segundos), seguidos de um ciclo de extensão pela DNA polimerase a 72°C, por 10 minutos. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as amplificações.

### 3.4 Quantificação dos produtos de PCR em gel de agarose e em espectrofotômetro

Os fragmentos amplificados por PCR foram visualizados em transiluminador U.V., após incubação com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, em gel de 1,5% de agarose, sujeitos à eletroforese (80 V/min). A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260/280 nm (relação de ácidos nucleicos e proteína) e 260/230 nm (relação de DNA e RNA), no espectrofotômetro de microvolume do ultra-violeta ao visível (UV-Vis) NanoDrop™ (Thermo Scientific).

### 3.5 Sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen). O sequenciamento automatizado foi realizado em Sequenciador Automático SeqStudio™ (AppliedBiosystems – ThermoFisher), na Plataforma de Sequenciamento de DNA - PSEQDNA (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil) utilizando os primers GTHV2 / GTHV3. A edição e o alinhamento das sequências foram conduzidos no MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 11 (TAMURA et al. 2021). As sequências obtidas foram submetidas ao *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local) para identificar sequências homólogas no GenBank e eliminar falsos positivos. As sequências geradas neste trabalho serão depositadas no banco de dados do GenBank (NCBI).

### 3.6 Análises utilizando sequências de nucleotídeos e redes haplotípicas

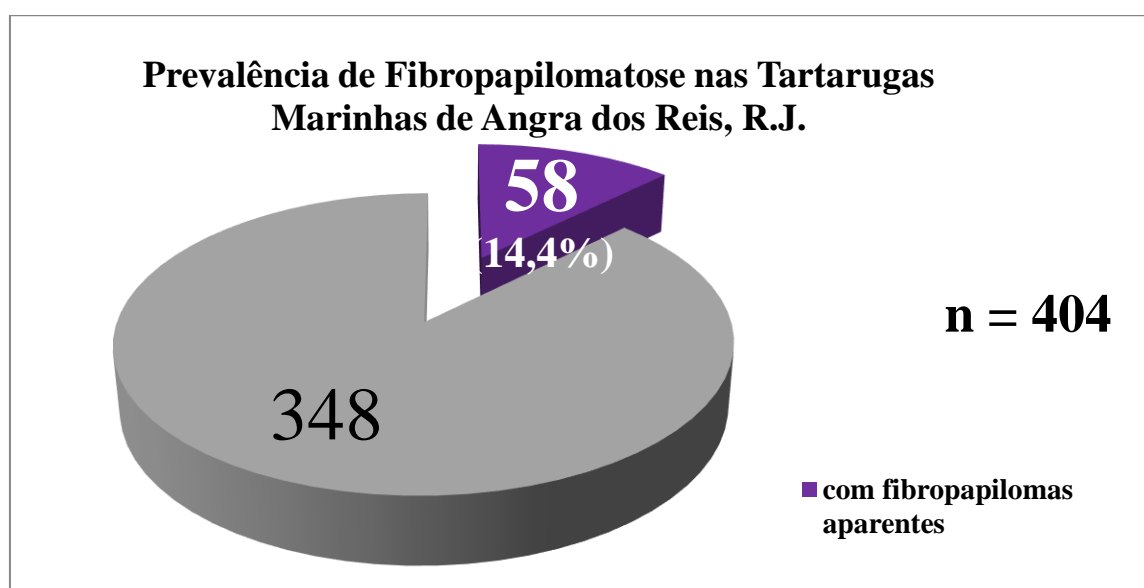
Árvores de máxima verossimilhança foram calculadas no programa RAxML v8.2.4 (STAMATAKIS, 2014), com valores de suporte de ramificação estimados por meio de 1000 réplicas do *Bootstrap* rápido; a busca pelas melhores árvores foi conduzida usando o modelo geral reversível no tempo (GTR) de substituição de nucleotídeos, sob o modelo GAMMA de heterogeneidade de taxas. Redes de variantes de ChHV5 foram recuperadas por meio de parcimônia estatística, conforme implementado no programa TCS v1.21 (CLEMENT et al., 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Amostragem

Durante os meses de julho de 2013 a setembro de 2016 (39 meses), o PROMONTAR-ANGRA coletou 404 amostras de tecido de tartarugas-verdes, *Chelonia mydas*, sendo 178 por mergulho de captura intencional e 222 pela rede remota de resgate de encalhes. Do total das 404 tartarugas analisadas, 58 (14,4%) foram registradas como possuindo fibropapilomas (Figura 17, Tabela 1 e 2). Separando por método de coleta das amostras, temos que do total das 178 tartarugas-verdes capturadas por mergulho de captura intencional, 31 (17,4%) foram registradas como possuindo fibropapilomas (Tabela 1); e de um total de 222 indivíduos da espécie *Chelonia mydas* registradas por meio da rede remota de resgate de encalhes nas praias da região, apenas 27 (12,1%) das tartarugas marinhas resgatadas apresentavam fibropapilomas aparentes (Tabela 2).

**Figura 17** - Prevalência de fibropapilomatose nas tartarugas marinhas registradas pela Rede Remota de Resgate de Encalhes e por mergulho de captura intencional nas praias de Angra dos Reis (R.J.).



Fonte: Relatório 16 do PROMONTAR-ANGRA para o IBAMA, 2016.

Observou-se que para o método de coleta de captura intencional por mergulho (realizado em Piraquara (Efluente das Usinas), Praia Vermelha (Controle 1) e Ilha do Pelado (Controle 2), foram amostradas nove, uma e 21 tartarugas, respectivamente (Figura 18). A correlação entre a temperatura alta da área de estudo e a presença da FP não foi observada, visto que no Efluente das Usinas, o número de tartarugas portando o vírus foi menor (9/31) do que na área controle 2 (21/31), mais distante, Ilha do Pelado (Figura 19).

**Figura 18** - Representação gráfica dos indivíduos capturados intencionalmente com fibropapilomatose nas áreas cobertas pela captura intencional por mergulho em Angra dos Reis, RJ.



Legenda: A seta rosa indica a área de estudo (Piraquara, Efluente das Usinas); em amarelo, estão as áreas utilizadas como controle próximo (Praia Vermelha) e distante (Ilha do Pelado), respectivamente, do Efluente das Usinas. Os gráficos representam o número de indivíduos capturados intencionalmente com fibropapilomatose (em laranja) sobre o número total amostrado (em azul).

Fonte: Google Earth; e a autora, 2022.

**Tabela 1** - Dados das amostras de tartarugas-verdes, coletadas vivas por mergulho de captura intencional. Fonte: PROMONTAR-ANGRA (2016).

Registro	Data	Horário	Local	CCC (cm)	LCC (cm)	Peso (kg)	Placas Cabeça	Condição Corpórea
MT01R1	25/09/2013	10:40	Efluente	32,0	27,9	3,20	3POE/2POE	Robusta
MT08	30/07/2013	10:00	Ilha do Pelado	40,0	36,5	5,00	NR	Robusta
MT09	30/07/2013	10:00	Ilha do Pelado	37,5	32,5	5,70	NR	Robusta
MT10	30/07/2013	10:00	Ilha do Pelado	45,0	38,0	8,50	NR	Robusta
MT018	10/08/2013	09:55	Ilha do Pelado	35,0	32,0	5,80	NR	Robusta
MT019	10/08/2013	09:55	Ilha do Pelado	38,5	34,0	6,50	4POE/4POD	Robusta
MT020	10/08/2013	09:55	Ilha do Pelado	43,2	40,1	9,00	NR	Robusta
MT23R2	21/11/2013	12:00	Efluente	39,3	32,8	6,00	4POE/4POD	Robusta
MT036	18/10/2013	11:30	Ilha do Pelado	35,1	32,6	5,10	5POE/4POE	Robusta
MT040	22/10/2013	11:00	Efluente	34,4	30,7	3,90	5POE/4POD	Robusta
MT045	18/12/2013	10:20	Efluente	40,7	35,1	5,50	4POE/5POD	Intermediária
MT048	19/12/2013	10:30	Ilha do Pelado	43,0	40,5	10,00	4POE/4POD	Robusta
MT049	20/12/2013	09:30	Praia Vermelha	29,0	26,1	2,50	5POE/4POD	Robusta
MT54R2	18/12/2014	12:00	Efluente	54,5	47,2	17,40	4POE/4POD	Robusta
MT061	19/03/2014	09:30	Ilha do Pelado	41,3	38,6	7,90	4POE/4POD	Robusta
MT062	19/03/2014	09:30	Ilha do Pelado	36,7	32,6	4,80	4POE/4POD	Ruim
MT066	10/04/2014	11:30	Ilha do Pelado	40,7	36,7	7,80	4POD	Robusta
MT067	10/04/2014	11:30	Ilha do Pelado	42,6	38,4	9,18	4POE/4POD	Robusta
MT072	23/05/2014	11:30	Efluente	40,6	36,0	7,60	4POE/4POD	Robusta
MT74R1	08/08/2014	11:00	Efluente	40,7	37,0	7,30	3POE/4POD	Robusta
MT076	23/05/2014	11:30	Efluente	46,6	41,4	12,00	4POE/4POD	Robusta
MT087	18/06/2014	09:50	Ilha do Pelado	43,2	38,1	9,30	3POE/3POD	Robusta
MT101	23/10/2014	11:00	Ilha do Pelado	45,0	40,0	11,1	4POE/4POD	Robusta
MT114	19/01/2015	10:30	Ilha do Pelado	42,5	37,5	8,47	4POE/4POD	Robusta
MT116	19/01/2015	12:35	Ilha do Pelado	41,5	40,0	8,25	4POE/4POD	Intermediária
MT117	12/02/2015	11:03	Ilha do Pelado	36,8	32,6	5,81	4POE/5POD	Robusta
MT118	12/02/2015	11:03	Ilha do Pelado	36,8	33,5	5,89	4POE/4POD	Robusta
MT119R1	18/08/2015	10:50	Ilha do Pelado	39,3	35,5	5,98	4POE/4POD	Ruim
MT146	25/11/2015	10:18	Ilha do Pelado	34,3	30,2	4,35	5POE/3POD	Intermediária
MT156	21/01/2016	10:05	Efluente	51,0	45,1	14,10	4POE/4POD	Intermediária
MT160R2	03/05/2016	10:56	Ilha do Pelado	33,2	28,8	4,25	4POE/5POD	Intermediária
<b>Total</b>								<b>31</b>

Onde: CCC = comprimento curvilíneo de carapaça; LCC = largura curvilínea de carapaça; 4POE/4POD = quatro placas orbitais Esquerda / quatro placas orbitais Direita; NR = não registrado.

Fonte: A autora, 2022.

**Tabela 2** - Dados das amostras de tartarugas-verdes coletadas por meio da rede remota de encalhes. Fonte: PROMONTAR-ANGRA (2016).

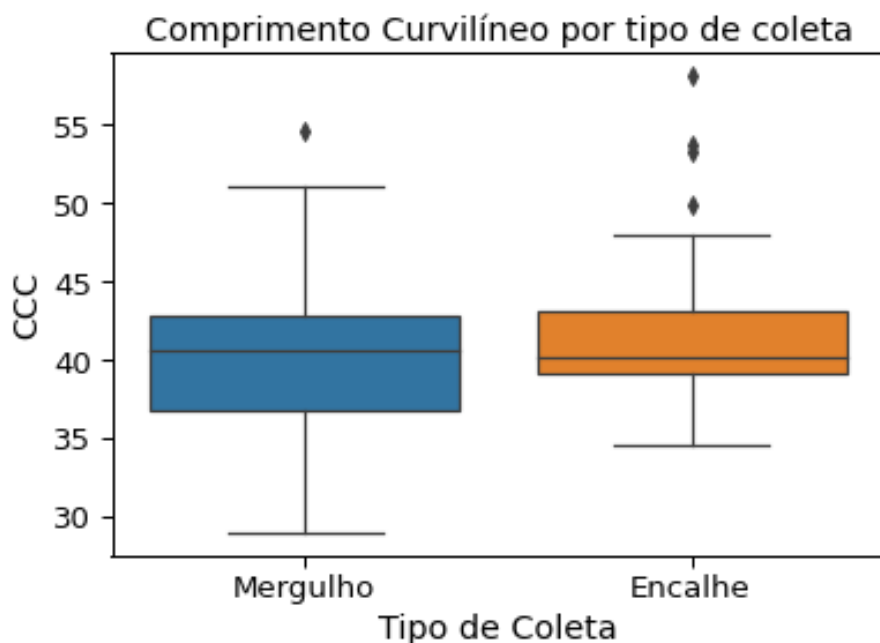
Registro	Data	Horário	Local	CCC (cm)	LCC (cm)	Peso (kg)	Condição	Placas Cabeça	Condição Corpórea	Interação com pesca
RT014	08/10/2013	11:00	P de São Gonçalo	39,1	34,6	NR	Morta	NR	NR	NR
RT016	21/10/2013	16:05	P Mambucaba	43,1	40,5	5,5	Morta	4POE/4POD	Ruim	NÃO
RT030	05/12/2013	15:45	P Tarituba	39,7	34,4	NR	Viva	4POE/4POD	Robusta	NR
RT040	04/02/2014	09:00	Canal das Usinas (fora)	37,8	32,5	4,2	Morta	4POE/4POD	Intermediária	NR
RT042	23/02/2014	10:00	P da Itinga	38,0	34,2	4,1	Viva	4POE/4POD	Ruim	NR
RT046	13/05/2014	17:15	Marina Piratas	NR	NR	NR	Morta	NR	Ruim	SIM
RT048	19/05/2014	11:45	P de São Gonçalo	39,9	36,0	7,2	Morta	4POE/4POD	Robusta	NÃO
RT049	04/06/2014	09:30	Praia Grande	37,7	33,4	NR	Morta	NR	NR	NR
RT050	20/09/2014	16:00	Guarita Piraquara	41,0	36,4	NR	Morta	4POD/4POE	Robusta	NR
RT051	09/06/2014	16:35	Cst Marina Piratas	39,5	37,5	5,3	Morta	5POE/4POD	Intermediária	NÃO
RT065	09/10/2014	09:45	Costeirinha	34,6	30,0	4,1	Morta	4POE/4POD	Intermediária	NR
RT090	09/12/2014	16:16	P de São Gonçalo	47,5	44,3	NR	Morta	NR	Robusta	NÃO
RT104	24/02/2015	15:20	Costeirinha	53,2	45,9	NR	Morta	NR	NR	NR
RT111	20/07/2015	13:10	P Vermelha	35,9	31,8	5,1	Morta	4POE/4POD	Robusta	SIM
RT115	07/08/2015	09:00	P das Goiabas	35,2	31,2	4,9	Morta	4POE/4POD	Intermediária	SIM
RT144	30/10/2015	11:34	P da Batanguera	39,7	36,2	6,5	Viva	4POE/4POD	Intermediária	NÃO
RT146	05/11/2015	14:40	Marina da Ribeira	43,0	38,5	10,7	Viva	4POE/4POD	Robusta	NÃO
RT164	12/01/2016	15:01	Itanema	39,2	37,9	7,1	Viva	4POE/4POD	Intermediária	NÃO
RT168	27/01/2016	10:50	P de São Gonçalo	42,8	41,1	7,6	Morta	5POE/5POD	Intermediária	NÃO
RT177	24/02/2016	07:07	P da Batanguera	39,2	36,6	5,1	Viva	4POE/4POD	Ruim	NÃO
RT190	26/05/2016	13:10	Ilha da Gipóia	41,7	38,4	6,4	Morta	NR	Ruim	NÃO
RT197	17/06/2016	11:40	Marina Angra Clube	48,0	44,2	8,7	Morta	4POE/4POD	Ruim	NÃO
RT203	23/06/2016	14:20	P de Garatucaia	49,8	46,9	12,4	Viva	4POE/4POD	Robusta	SIM
RT208	28/06/2016	13:03	P das Marrecas, Mombaça	53,7	48,5	12,2	Morta	4POE/4POD	Ruim	SIM
RT218	14/07/2016	11:55	Canal das Usinas (fora)	40,5	38,1	6,3	Viva	4POE/4POD	Intermediária	NÃO
RT227	15/08/2016	09:15	Canal das Usinas (fora)	58,1	53,9	16,4	Viva	4POE/4POD	Ruim	NÃO
RT228	17/08/2016	16:50	P Abraãozinho (IG)	42,7	39,8	6,7	Morta	4POE/4POD	Ruim	NÃO
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>									

Onde: P = Praia; Cst = Costão; IG = Ilha Grande; CCC = comprimento curvilíneo de carapaça; LCC = largura curvilínea de carapaça; 4POE/4POD = quatro placas orbitais Esquerda / quatro placas orbitais Direita; NR = não registrado.

Fonte: A autora, 2021.

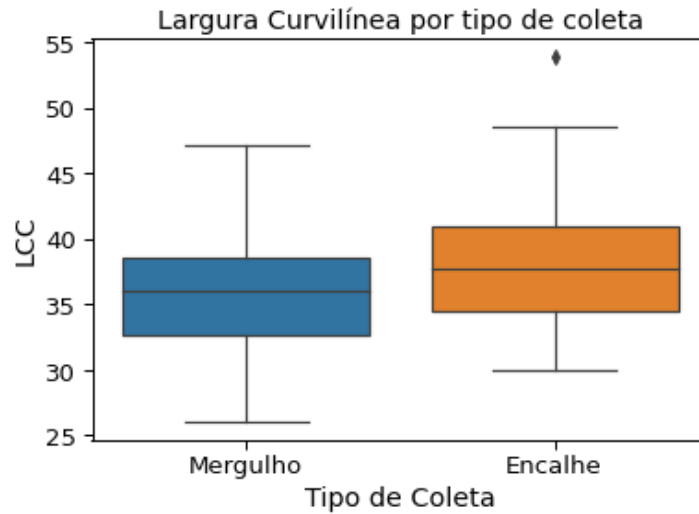
Os 222 indivíduos da espécie *Chelonia mydas* (71 vivos e 151 mortos) coletados pela rede remota de resgate de encalhes, foram classificados como juvenis, com medidas variando de 29,2 a 76 cm de CCC, 26,9 a 71,2 cm de LCC e 2,1 a > 20 kg de peso. Também do total de 178 indivíduos da espécie *Chelonia mydas* coletados por mergulho de captura intencional, todos foram considerados juvenis, com medidas variando de 29,0 a 60,1 cm de CCC, 26,1 a 54,5 cm de LCC e 2,5 a > 20,0 kg de peso (dados do Relatório final do PROMONTAR-ANGRA para o IBAMA, 2016; Gráficos 1, 2 e 3).

**Gráfico 1** - Relação do comprimento curvilíneo de carapaça para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe).



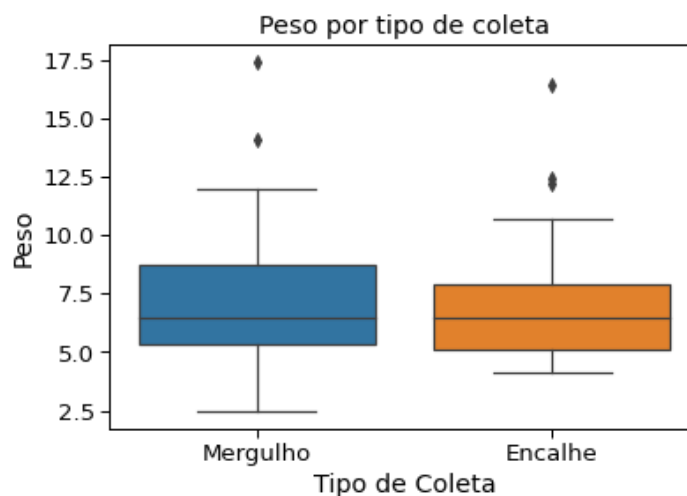
Legenda: Em azul está a captura intencional por mergulho e, em laranja, a coleta pela rede de resgate de encalhes.  
Fonte: A autora, 2022.

**Gráfico 2** - Relação da largura curvilínea de carapaça para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe).



Legenda: Em azul está a captura intencional por mergulho e, em laranja, a coleta pela rede de resgate de encalhes.  
Fonte: A autora, 2022.

**Gráfico 3** - Relação do peso dos indivíduos amostrados para os dois métodos de coleta (mergulho e encalhe).



Legenda: Em azul está a captura intencional por mergulho e, em laranja, a coleta pela rede de resgate de encalhes.  
Fonte: A autora, 2022.

Por questões de logística da coleta de amostras para a genética, nem todas as 58 tartarugas marinhas registradas possuindo fibropapilomas tiveram coletas de tecido. Conseguimos recuperar 41 (70,7%) amostras de tecido saudável e 15 amostras de tumores (Tabela 3), que prosseguiram para a extração de DNA genômico total.



**Tabela 3** - Resultado e concentrações em ng/μL das extrações de DNA genômico total de amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P).

Registro	Extração de DNA Papiloma			Extração de DNA Tecido Saudável		
	[conc. ng/μl]	datas		[conc. ng/μl]	datas	
MT001R1				SIM (CTAB) - BB	11/02/2020	124
MT018				SIM (CTAB) - BB	09/11/2020	509,1
MT019				SIM (CTAB) - N	09/11/2020	142,3
MT020				SIM (CTAB) - BMF	09/11/2020	708,3
MT036	P (CTAB-AL)	1862,2	18/08/2021	SIM (CTAB) - BF	09/03/2020	176,7
MT040				SIM (CTAB) - N	02/08/2021	66,7
MT045	P (CTAB) - BB	692,5	28/06/2021	SIM (CTAB) - BB	02/03/2020	723,1
MT048				SIM (CTAB) - BB	09/03/2020	62,1
MT049				TS (CTAB-AL)	18/08/2021	210,6
MT061				SIM (CTAB) - BB	02/08/2021	241,2
MT062				SIM (CTAB) - BMF	02/08/2021	186,7
MT066				SIM (CTAB) - BB	02/08/2021	1966,8
MT067				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	1820,8
MT072				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	232,9
MT076				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	11,6
MT087				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	915,6
MT101	P (CTAB-AL)	174,8	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	28/06/2021	162,3
MT114	P (CTAB-AL)	1519,1	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	14/04/2021	428,9
MT116	P (CTAB-AL)	9465,8	18/08/2021	SIM (CTAB) - N	28/06/2021	13,7
MT117				SIM (CTAB) - BB	09/12/2020	283,6
MT118				SIM (CTAB) - N	09/12/2020	1017,2
MT146	P (CTAB) - BB	1638,1	03/08/2021	SIM (CTAB) - BB	01/07/2021	216,8
MT156	P (CTAB) - BB	924,1	28/06/2021			
RT014				SIM (CTAB) - BF	18/08/2021	350,7
RT016				SIM (CTAB) - BB	11/02/2020	1240,1
RT030				SIM (CTAB) - N	18/08/2021	52,7
RT040				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	335,6
RT042				SIM (CTAB) - BMF	18/08/2021	1277
RT046	P (CTAB) - BB	4146	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	549,6
RT048	P (CTAB) - BF	1138,9	18/08/2021	SIM (CTAB) - BF	18/08/2021	290,7
RT049				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	175,1
RT050				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	271,1
RT051				TS (CTAB-AL)	18/08/2021	1084,2
RT065	P (CTAB) - BB	1309,9	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	47,4
RT090	P (CTAB) - BB	2207,2	18/08/2021	SIM (CTAB) - N	18/08/2021	261,8
RT111	P (CTAB) - BB	1218,8	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	428,8
RT115				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	7,391
RT144				SIM (CTAB) - N	18/08/2021	62,4
RT146	P (CTAB) - BB	4146	18/08/2021	SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	324,6
RT164	P (CTAB) - BB	2069,3	01/07/2021	SIM (CTAB) - BB	27/01/2021	992,6
RT168				SIM (CTAB) - N	01/07/2021	35,7
RT197				SIM (CTAB) - BB	18/08/2021	455,4
RT208	P (CTAB) - N	149,6	01/07/2021			

**Total = 43**

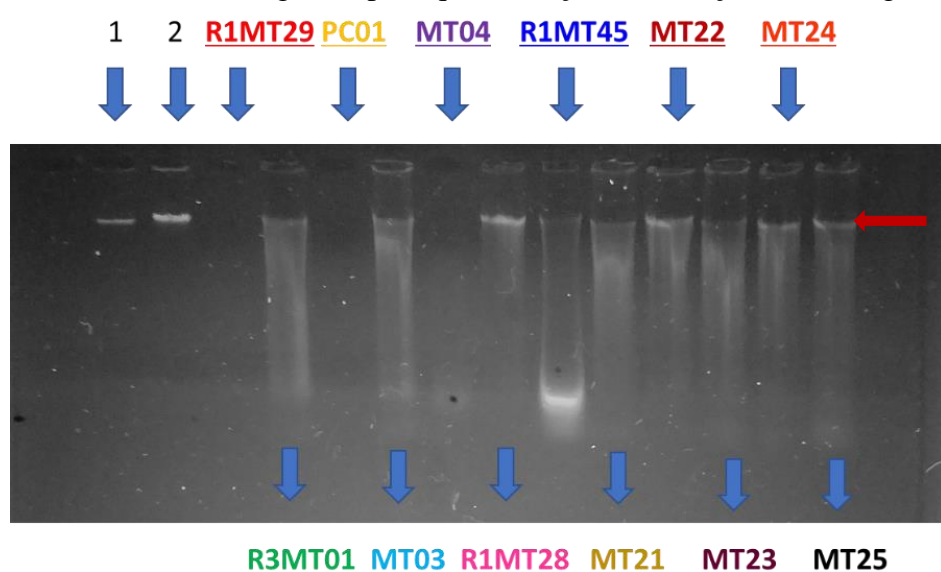
Onde: MT = tartarugas capturadas vivas em mergulho de captura intencional; RT = tartarugas encontradas encalhadas por meio de rede remota de resgate; CTAB ou Salina = método de extração do DNA genômico; AL = extrações realizadas por Aline Leal; BB = Banda boa; BMF = Banda muito fraca; BF = Banda fraca; N = Nenhuma banda.

Fonte: A autora, 2021.

## 4.2 Extração de DNA total de amostras de tartarugas-verdes com fibropapilomatose

As extrações do DNA genômico das 56 amostras (41 de tecido saudável e 15 de tumores) obtidas resultaram em DNA de alto peso molecular, como ilustrado na Figura 19. Na Tabela 3, encontram-se os resultados da quantificação por espectrofotometria.

**Figura 19** - Gel de 0,8% de agarose para quantificação da extração de DNA genômico total.



Amostra	260/280	260/230	Gel
R1 MT 29	1,96	1,89	nd
R3 MT 01	1,93	1,83	B
PC 01	1,78	1,56	nd
MT 03	2	2,1	B
MT 04	1,73	0,85	B MF
R1 MT 28	1,91	2,1	B
R1 MT 45	2,04	2,18	B
MT 21	2	1,87	B
MT 22	1,94	1,66	B
MT 23	1,74	1,97	B
MT 24	1,98	2,07	B
MT 25	1,93	2,01	B

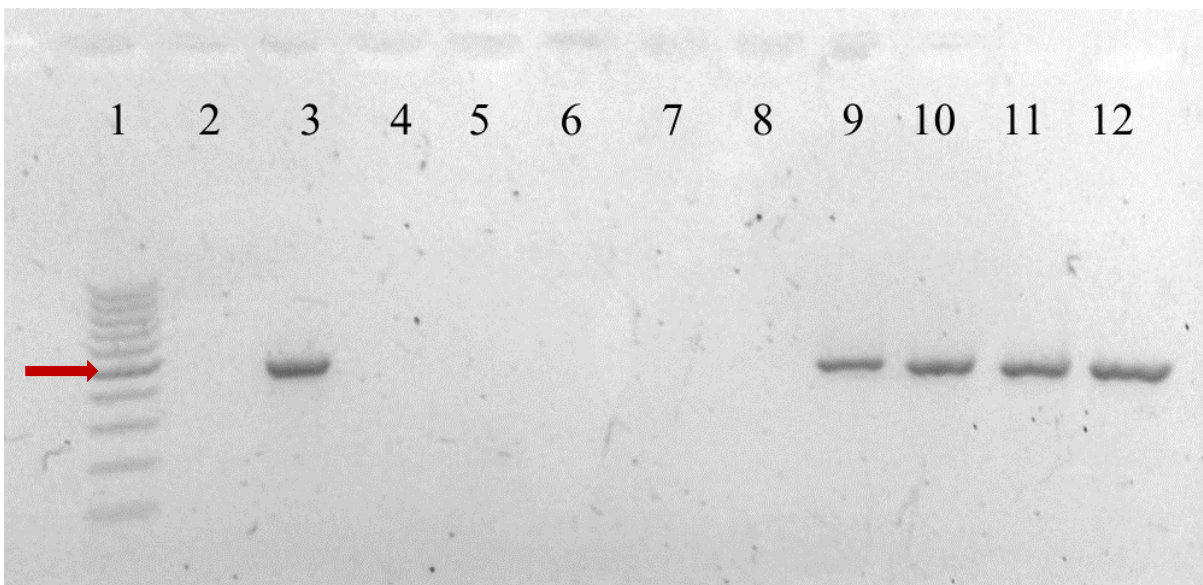
Legenda: Visualização dos produtos de extração de DNA genômico de tecido saudável e de papilomas (tumores) de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). Os poços 1 e 2 são os marcadores de concentração de DNA genômico de fago lambda ( $\lambda$ ) nas concentrações de 10 e 50 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Os poços 3 a 14 contêm o DNA genômico extraído de amostras de tartarugas capturadas em campanhas de mergulho de captura intencional. A seta na cor vermelha indica o DNA de alto peso molecular. Quadro: 260/280 = relação de absorvância em 260 e 280 nm, DNA/proteína; 260/230 = relação de absorvância em 260 e 230 nm, DNA/RNA; B = Banda boa; BMF = Banda muito fraca; nd = Não detectado, nenhuma banda.

Fonte: A autora, 2020.

### 4.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 20 é um exemplo de gel de agarose 1,5 % para verificação da amplificação do fragmento da DNA polimerase (DNApol) do alfa-herpesvírus 5 quelonídeo, gerando um *amplicon* de aproximadamente 483 pares de bases (pb)(considerando que o marcador de 500 pb é mais concentrado, é fácil comparar os tamanhos). Na Tabela 4, encontram-se os resultados das amplificações por PCR usando os primers senso e reverso, GTHV2 e GTHV3, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P). Vinte e sete amostras (~48%), do total de 56 amostras, originaram o produto de PCR do tamanho esperado, de 483 pares de bases (pb).

**Figura 20** - Gel 1,5% de agarose para verificação da amplificação do fragmento da DNA polimerase (DNApol) do alfa-herpesvírus 5 quelonídeo por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando os primers senso e reverso, GTHV2 e GTHV3, respectivamente.



Legenda: Visualização da amplificação por PCR do fragmento da DNA polimerase (DNApol) do alfa-herpesvírus 5 quelonídeo de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). As amplificações das amostras presentes nos poços 3 (controle positivo, amostra de tumor), 9 - 12 apresentaram aproximadamente 483 pares de bases (pb) de acordo com a comparação com o marcador de peso molecular *Ladder* 100 bp no poço 1. O controle negativo encontra-se no poço 2. A seta na cor vermelha indica o fragmento de 500 pb do *DNA Ladder* 100 bp (Sinapse, tamanhos: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp).

Fonte: A autora, 2020.

**Tabela 4** - Resultado das amplificações por PCR do fragmento do gene da DNA polimerase (DNAPol) do genoma do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5) usando os primers senso e reverso, GTHV2 e GTHV3, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P).

Registro	PCR virus Primers GTHV2 + GTHV3	Tipo de material	[conc]	datas
MT001R1	NA	Tecido	Puro, 25 ng e 50 ng	24/08/2021
MT018	NA	Tecido	Puro, 25 ng e 50 ng	24/08/2021
MT019	NA	Tecido	Puro, 25 ng e 50 ng	24/08/2021
MT020	NA	Tecido	Puro, 25 ng e 50 ng	24/08/2021
MT036	Amp – BB	Tecido	Pura, 1:10 e 1:50	23/06/2021
MT036	Amp – BB	Papiloma	Pura, 1:10 e 1:50	23/06/2021
MT040	NA	Tecido	Puro e 1:10	26/08/2021
MT045	Amp – BB	Tecido	01:10	27/07/2021
MT045	Amp – BB	Papiloma	01:10	27/07/2021
MT048	Amp – BB	Tecido	Puro, 0,5 µL e 1:10	16/09/2021
MT049	Amp – BF	Tecido	Pura	29/09/2021
MT061	NA	Tecido	Puro, 1:5 e 1:10	26/08/2021
MT062	Amp – BB	Tecido	Puro e 1:5	26/08/2021
MT066	NA	Tecido	Puro, 50 ng e 100 ng	01/09/2021
MT067	Amp – BB	Tecido	Puro, 50 ng e 100 ng	16/09/2021
MT072	NA	Tecido	Puro, 25 ng e 50 ng	01/09/2021
MT076	Amp – BF	Tecido	Puro	29/09/2021
MT087	Amp – BB	Tecido	Puro, 50 ng e 100 ng	01/09/2021
MT101	Amp – BB	Tecido	01:10	17/09/2021
MT101	Amp – BB	Papiloma	01:10	17/09/2021
MT114	Amp – BB	Tecido	01:05	29/09/2021
MT114	NA	Papiloma	01:05	29/09/2021
MT116	NA	Tecido	Puro (1 µL, 2 µL e 3 µL)	02/09/20021
MT116	NA	Papiloma	Puro (1 µL, 2 µL e 3 µL)	02/09/20021
MT117	NA	Tecido	25 ng e 50 ng	02/09/2021
MT118	NA	Tecido	25 ng e 50 ng	02/09/2021
MT146	Amp – BB	Tecido	1:10 e 1:50	27/07/2021
MT146	Amp – BB	Papiloma	1:10 e 1:50	27/07/2021
MT156	NA	Papiloma	Pura	21/07/2021
RT014	NA	Tecido	25 ng e 50 ng	07/10/2021
RT016	Amp – BMF	Tecido	1 200	07/10/2021
RT030	Amp – BB	Tecido	Puro e 1:10	24/09/2021
RT040	Amp – BB	Tecido	01:20	24/09/2021
RT042	Amp – BB	Tecido	50 ng	16/06/2021
RT046	NA	Tecido	1:50	07/10/2021
RT046	NA	Papiloma	1:50	07/10/2021
RT048	NA	Tecido	1:5 e 1:10	07/10/2021
RT048	NA	Papiloma	1:5 e 1:10	07/10/2021
RT049	NA	Tecido	1:20	07/10/2021
RT050	Amp – BB	Tecido	50 ng	08/09/2021
RT051	Amp - BB	Tecido	01:10	28/09/2021
RT065	NA	Tecido	Puro (1 µL e 0,5 µL)	09/09/2021

RT065	NA	Papiloma	Puro (1 µL e 0,5 µL)	09/09/2021
RT090	Amp – BB	Tecido	Puro e 1:05	29/09/2021
RT090	Amp – BB	Papiloma	Puro e 1:05	29/09/2021
RT111	NA	Tecido	25 ng e 50 ng	08e29/09/2021
RT111	NA	Papiloma	25 ng e 50 ng	08e29/09/2021
RT115	NA	Tecido	25 ng, 50 ng e 100ng	09/09/2021
RT144	NA	Tecido	Puro (1 µL e 0,5 µL)	09/09/2021
RT146	NA	Tecido	25 ng e 50 ng	03/09/2021
RT146	Amp – BB	Papiloma	25 ng e 50 ng	03/09/2021
RT164	NA	Tecido	1:10 e 1:50	27/07/2021
RT164	Amp – BB	Papiloma	1:10 e 1:50	27/07/2021
RT168	Amp – BB	Tecido	Puro (1 µL)	10/09/2021
RT197	Amp – BB	Tecido	1:25 e 1:50	28/09/2021
RT208	NA	Papiloma	1:25 e 1:50	28/09/2021

**Total = 56**

**Amplificaram = 27**

**Seguiram para sequ = 26**

Onde: Amp = Amplificou; NA = Não Amplificou; MT = tartarugas capturadas vivas em mergulho de captura intencional; RT = tartarugas encontradas enalhadas por meio de rede remota de resgate; BB = Banda boa; BMF = Banda muito fraca; BF = Banda fraca; NA = Não amplificou, nenhuma banda.

Fonte: A autora, 2021.

#### 4.4 Sequenciamento dos produtos amplificados

Após a amplificação da região desejada do fragmento da DNA polimerase (DNAPol) do herpesvírus quelonídeo de *Chelonia mydas*, 26 amostras foram sequenciadas, a fim de determinar a ordem dos nucleotídeos nos fragmentos analisados. Na Tabela 5, encontram-se os resultados do sequenciamento Sanger usando separadamente os primers senso e reverso, GTHV2 e GTHV3, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P). Vinte e uma amostras originaram sequências que puderam ser utilizadas, e determinado o haplótipo (ou variante) de classificação do vírus. Foram identificados dois haplótipos, correspondentes as variantes virais do herpesvírus ChHV5, aqui identificadas como B7 (N=15), e B8 (N=6), nas 21 amostras que tiveram sucesso na amplificação e sequenciamento. Dois indivíduos apresentaram ambas as variantes/haplótipos: a tartaruga MT48 (uma amostra, tecido saudável) e a MT146 (duas amostras, tecido saudável e papiloma), sendo que o primeiro possuiu ambas as variantes/haplótipos no mesmo tipo de tecido e, o segundo, em tecidos diferentes (B7 para o papiloma e B8 para o tumor), como exemplificado na Figura 21.

**Tabela 5** - Resultado do sequenciamento Sanger usando separadamente os primers senso e antisenso, GTHV2 e GTHV3, em amostras de Tecido Saudável (TS) e Papiloma (P).

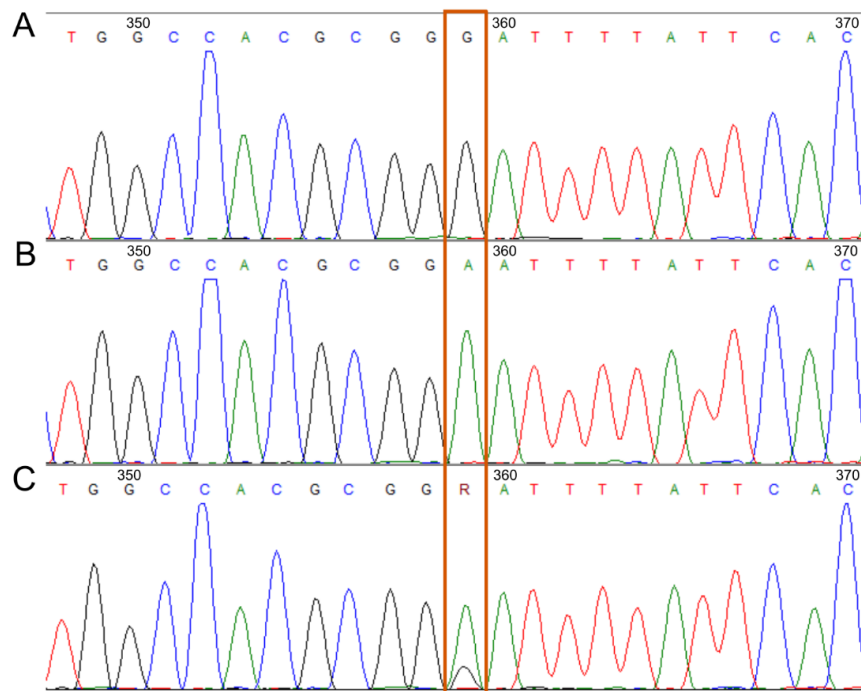
Registro	PCR vírus Primers		Tipo de material	Qualidade da sequência	
	GTHV2 + GTHV3			Primers GTHV3 / GTHV2	Grupo/Haplótipo
MT036	Amp - BB		Papiloma	Boa / boa	B7
MT045	Amp - BB		Tecido	Boa / razoável	B7
MT045	Amp - BB		Papiloma	Contaminada / razoável	B7
MT048	Amp - BB		Tecido	Ruim / boa	B7 e B8
MT049	Amp - BF		Tecido	Ruim / ruim	nd
MT062	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B7
MT067	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B7
MT076	Amp - BF		Tecido	Ruim / ruim	nd
MT087	Amp - BB		Tecido	Ruim / boa	B7
MT101	Amp - BB		Papiloma	Boa / boa	B8
MT114	Amp - BB		Tecido	Boa / contaminada	B7
MT116	NA*		Papiloma	Truncada / truncada	nd
MT116	NA*		Tecido	Contaminada / truncada	nd
MT146	Amp - BB		Papiloma	Boa / boa	B7
MT146	Amp - BB		Tecido	Razoável / razoável	B8
RT030	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B7
RT040	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B7
RT042	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B7
RT050	Amp - BB		Tecido	Boa / contaminada	B7
RT051	Amp - BB		Tecido	Boa / ruim	B7
RT090	Amp - BB		Papiloma	Boa / boa	B7
RT090	Amp - BB		Tecido	Truncada / truncada	nd
RT146	Amp - BB		Papiloma	Boa / boa	B8
RT164	Amp - BB		Papiloma	Ruim / razoável	B8
RT168	Amp - BB		Tecido	Boa / boa	B8
RT197	Amp - BB		Tecido	Boa / contaminada	B8

**Total = 21**

Onde: Amp = Amplificou; NA = Não Amplificou; MT = tartarugas capturadas vivas em mergulho de captura intencional; RT = tartarugas encontradas encalhadas por meio de rede remota de resgate; BB = Banda boa; BMF = Banda muito fraca; BF = Banda fraca; NA\* = Não amplificou, nenhuma banda, não deveria ter sido sequenciada, erro de seleção de amostra.

Fonte: A autora, 2021.

**Figura 21** - Eletroferograma do sequenciamento de três amostras do fragmento da DNA polimerase (DNAPol) do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5) de *Chelonia mydas*.



Legenda: Visualização do eletroferograma evidenciando os picos de cada base nitrogenada nas fitas Senso (*Foward*), e Antisense (*Reverse*). Cada uma das bases está representada por uma cor, a saber: preta indica a Guanina; verde, a Adenina; em vermelho, a Timina; e azul, a Citosina. Onde: A. amostra MT146P (haplótipo B7); B. amostra MT101P (haplótipo B8); C. amostra MT48TS (presença de ambas as bases dos haplótipo B7 e B8); TS = Tecido Saudável e P = Papiloma.

Fonte: A autora, 2021.

#### 4.5 Análises utilizando sequências de nucleotídeos e frequências haplotípicas

A Tabela 6 apresenta a listagem das variantes do ChHV5 encontradas nesta dissertação com outras variantes da mesma região (Brasil/Atlântico Ocidental), ou de outras regiões dos Oceanos Atlântico (América do Norte - Flórida; Caribe – Barbados e Porto Rico; África - Ilha Príncipe) e do Pacífico (América do Norte - Califórnia; América Central – Costa Rica, Mexico e Nicarágua; Austrália e Hawaii). As variantes B2 (Brasil - BA), B3 (Costa Rica), B5 e B6 (Austrália), B9 (Brasil - SP), B10 (Brasil - PR), B11, B12, B13 (Ilha Príncipe), e B14 (Porto Rico) aparecem apenas uma única vez. Por outro lado, as variantes A (16 vezes - Califórnia, Costa Rica, México, Nicarágua, Brasil-PR, e Porto Rico), B1 (nove vezes – Flórida, Barbados e Brasil - CE), B4 (quatro vezes – Hawaii e Costa Rica), B7 (49 vezes - Ilha Príncipe, Porto Rico, Brasil- ES, RJ, SP, PR), e B8 (13 vezes - Brasil- RJ, SP, PR) são as mais frequentes.

**Tabela 6** - Identificação das variantes do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5), com Nº de Acesso, Espécie, Ano de coleta das amostras, Código do País, Região, País / Região, tipo de Grupo / Variante, e Referências, em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.

Nº de Acesso	Espécie	Ano	Código do País	Região	País / Região	Grupo / Variante	Referência
Amostra_1_MT45TS	CM	2013	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_2_MT45P	CM	2013	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_5_MT146TS	CM	2015	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
Amostra_6_MT146P	CM	2015	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_8_RT90P	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_9_MT36P	CM	2013	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_10_MT101P	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
Amostra_11_RT146P	CM	2015	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
Amostra_12_RT164P	CM	2016	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
Amostra_13_MT48TS	CM	2013	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_15_MT62TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_16_MT67TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_18_MT87TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_19_MT114TS	CM	2015	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_20_RT30TS	CM	2013	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_21_RT40TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_22_RT42TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_23_RT50TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_24_RT51TS	CM	2014	BRA	RJ	Brasil, RJ	B7	essa dissertação
Amostra_25_RT168TS	CM	2016	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
Amostra_26_RT197TS	CM	2016	BRA	RJ	Brasil, RJ	B8	essa dissertação
AF035003	CM	1997	USA	HI	Havaí	B4	Quackenbush et al. 1998
AF035004	CM	1997	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Quackenbush et al. 1998
AF035005	CC	1997	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Quackenbush et al. 1998
AF049904	LO	1997	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	A	Quackenbush et al. 1998
AF239684	CM	2000	USA	HI	Havaí	B4	Yu et al. 2001
AF299107	CC	b2000	AUS	PAC	Austrália, Pacífico	B5	Quackenbush et al. 2001
AF299108	CM	2000	AUS	PAC	Austrália, Pacífico	B6	Quackenbush et al. 2001
AF299109	LO	2000	MEX	PAC	México, Pacífico	A	Quackenbush et al. 2001
AF299110	CM	2000	BRB	Caribe	Barbados	B1	Quackenbush et al. 2001
AY390420	CM	2001	USA	HI	Havaí	B	Greenblatt et al. 2005a
AY390421	CM	2001	PRI	Caribe	Porto Rico	A	Greenblatt et al. 2005a
AY390422	CM	2000	USA	CA	Estados Unidos, CA	A	Greenblatt et al. 2005a
AY395516	CC+EI	2001	USA	FL	Estados Unidos, FL	A	Greenblatt et al. 2005b
AY646888	CC	1993	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Ene et al. 2005
AY646889	CC	1995	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Ene et al. 2005
AY646890	CC	1993	USA	FL	Estados Unidos, FL	A	Ene et al. 2005
AY646891	CM	1990	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Ene et al. 2005
AY646892	CM	1994	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Ene et al. 2005
AY646893	CM	1993	USA	HI	Havaí	B4	Ene et al. 2005
AY646894	LK	2002	USA	FL	Estados Unidos, FL	B1	Ene et al. 2005
HQ878327	CM	2003	USA	HI	Havaí	B4	Ackermann et al. 2012
HM348895	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B12	Patricio et al. 2012
HM348896	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B7	Patricio et al. 2012
HM348897	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B11	Patricio et al. 2012
HM348898	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B7	Patricio et al. 2012
HQ000006	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B13	Patricio et al. 2012
HQ000007	CM	2009	STP	África	Ilha Príncipe	B7	Patricio et al. 2012
JN580279	CM	2009	PRI	Caribe	Porto Rico	B7	Patricio et al. 2012
JN580280	CM	2010	PRI	Caribe	Porto Rico	B7	Patricio et al. 2012
JN580281	CM	2010	PRI	Caribe	Porto Rico	B7	Patricio et al. 2012
JN580282	CM	2010	PRI	Caribe	Porto Rico	B7	Patricio et al. 2012
JN580283	CM	2006	PRI	Caribe	Porto Rico	B14	Patricio et al. 2012

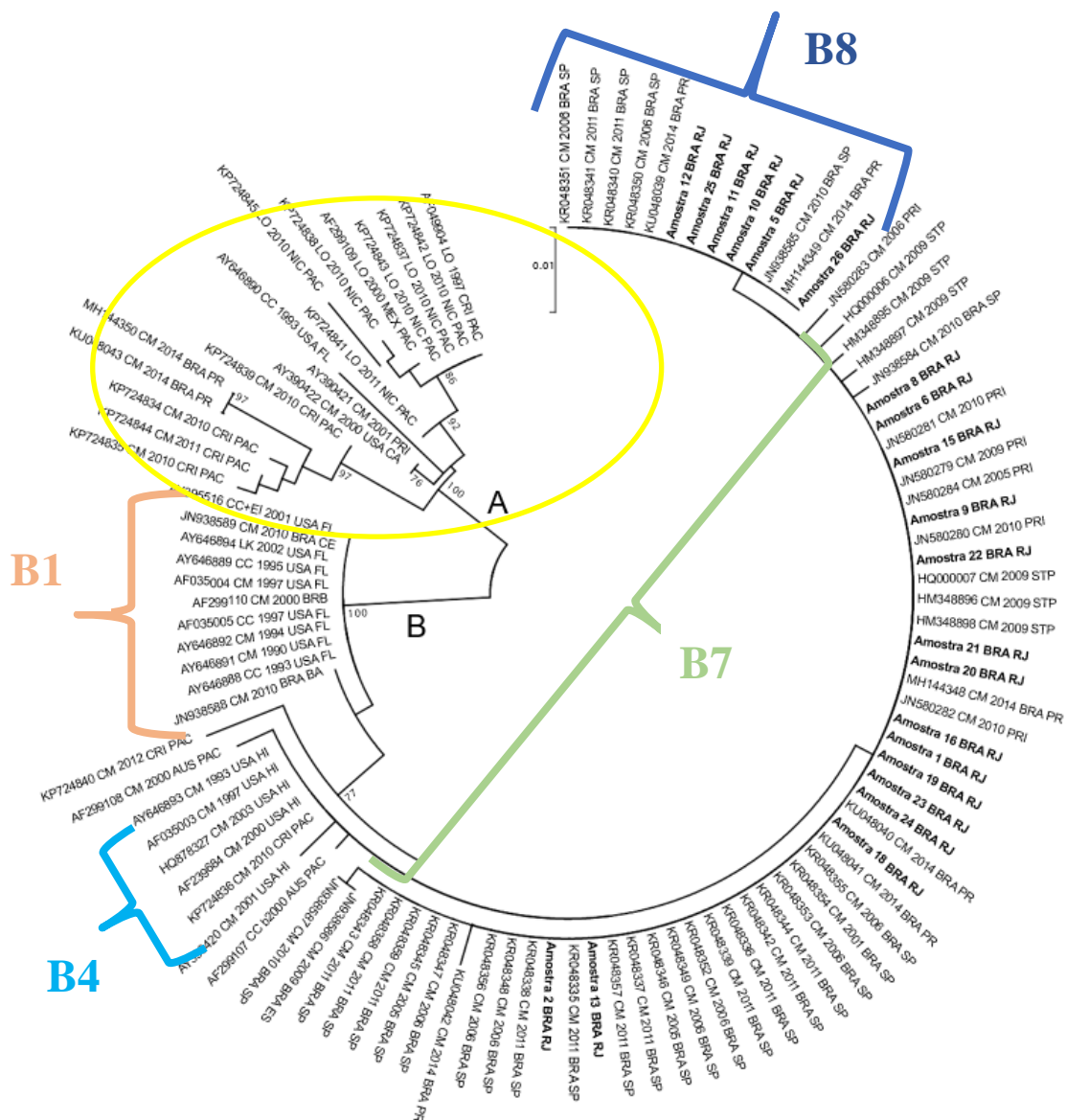


JN580284	CM	2005	PRI	Caribe	Porto Rico	B7	Patricio et al. 2012
JN938584	CM	2010	BRA	SP	Brasil, SP	B9	Rodenbusch et al. 2012
JN938585	CM	2010	BRA	SP	Brasil, SP	B8	Rodenbusch et al. 2012
JN938586	CM	2009	BRA	ES	Brasil, ES	B7	Rodenbusch et al. 2012
JN938587	CM	2010	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Rodenbusch et al. 2012
JN938588	CM	2010	BRA	BA	Brasil, BA	B2	Rodenbusch et al. 2012
JN938589	CM	2010	BRA	CE	Brasil, CE	B1	Rodenbusch et al. 2012
KP724834	CM	2010	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724835	CM	2010	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724836	CM	2010	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	B4	Chaves et al. 2017
KP724837	LO	2010	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724838	LO	2010	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724839	CM	2010	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724840	CM	2012	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	B3	Chaves et al. 2017
KP724841	LO	2011	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724842	LO	2010	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724843	LO	2010	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724844	CM	2011	CRI	PAC	Costa Rica, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KP724845	LO	2010	NIC	PAC	Nicarágua, Pacífico	A	Chaves et al. 2017
KR048335	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048336	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048337	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048338	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048339	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048340	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B8	Monezi et al. 2016
KR048341	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B8	Monezi et al. 2016
KR048342	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048343	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048344	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048345	CM	2005	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048346	CM	2005	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048347	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048348	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048349	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048350	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B8	Monezi et al. 2016
KR048351	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B8	Monezi et al. 2016
KR048352	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048353	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048354	CM	2001	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048355	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048356	CM	2006	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048357	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048358	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KR048359	CM	2011	BRA	SP	Brasil, SP	B7	Monezi et al. 2016
KU048039	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B8	Domiciano et al. ñ-pub?
KU048040	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B7	Domiciano et al. ñ-pub?
KU048041	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B7	Domiciano et al. ñ-pub?
KU048042	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B10	Domiciano et al. ñ-pub?
KU048043	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	A	Domiciano et al. ñ-pub?
MH144348	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B7	Domiciano et al. 2019
MH144349	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	B8	Domiciano et al. 2019
MH144350	CM	2014	BRA	PR	Brasil, PR	A	Domiciano et al. 2019

Onde: CM = *Chelonia mydas*; CC = *Caretta caretta*; EI = *Eretmochelys imbricata*; LO = *Lepidochelys olivacea*; LK = *Lepidochelys kempii*; AUS = Austrália; BRA = Brasil; BRB = Barbados; CRI = Costa Rica; MEX = México; NIC = Nicarágua; PRI = Porto Rico; STP = Ilha Príncipe; USA = Estados Unidos; CA = Califórnia; FL = Flórida; HI = Havaí; PAC = Pacífico; BA = Bahia; CE = Ceará; ES = Espírito Santo; PR = Paraná; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo; ñ-pub? = dados não publicados? As cores em três tons de verde, referem-se aos anos de coleta das amostras. As cores em dois tons de azul, cinza e branco, se referem as diferentes variantes. Em amarelo, estão as amostras do Brasil, e em laranja, as amostras de outras espécies de tartaruga, não *Chelonia mydas*. Fonte: A autora, 2021.

A Figura 22 representa a relação entre as variantes na forma de uma árvore de Máxima Verosimilhança.

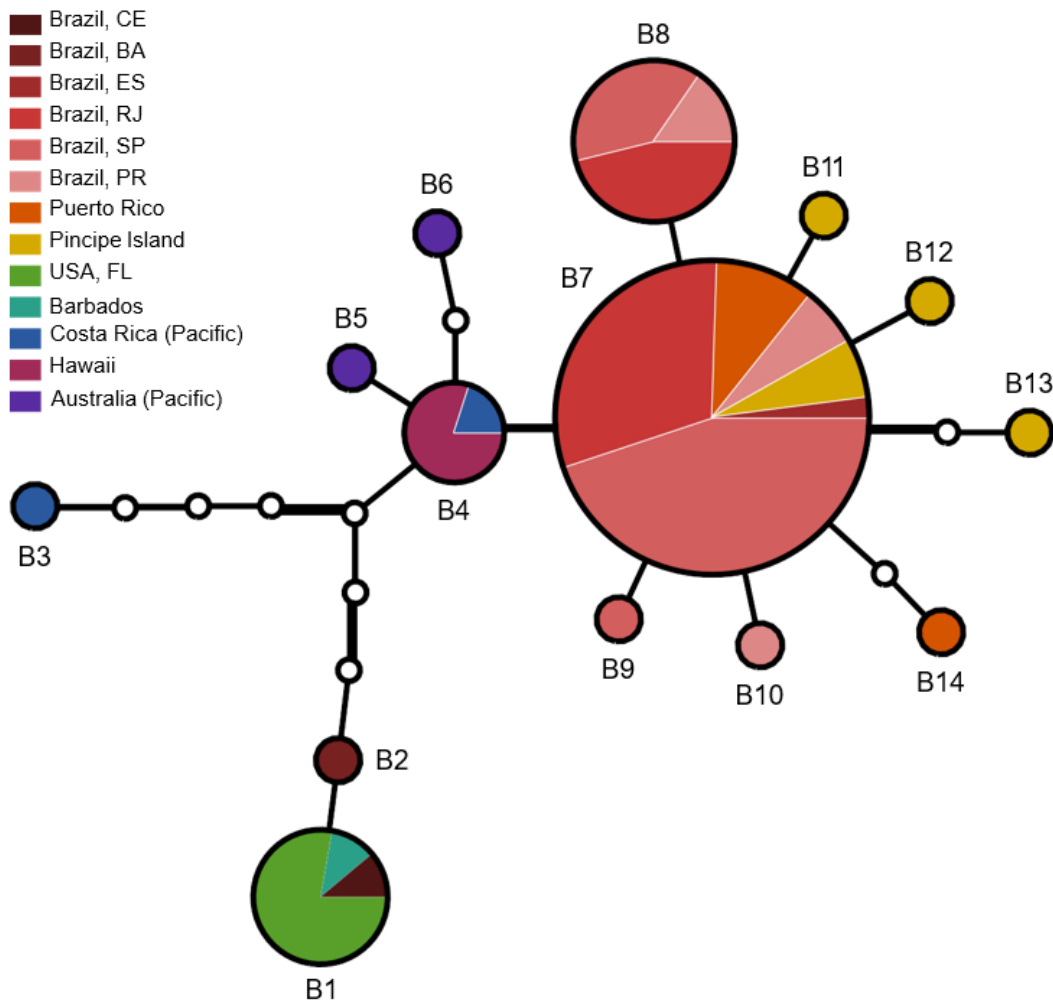
**Figura 22** - Análise filogenética das sequências parciais da DNA polimerase do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5). Árvore de Máxima Verosimilhança da relação entre as variantes encontradas neste estudo e em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.



Legenda: Os valores de bootstrap são mostrados para os pontos de ramificação. Sequências de nucleotídeos de Angra dos Reis (R.J.) foram geradas neste estudo e comparadas com sequências de ChHV5 do Genbank. CM = *Chelonia mydas*; CC = *Caretta caretta*; EI = *Eretmochelys imbricata*; LO = *Lepidochelys olivacea*; LK = *Lepidochelys kempii*; AUS = Austrália; BRA = Brasil; BRB = Barbados; CRI = Costa Rica; MEX = México; NIC = Nicarágua; PRI = Porto Rico; STP = Ilha Príncipe; USA = Estados Unidos; CA = Califórnia; FL = Flórida; HI = Havaí; PAC = Pacífico; BA = Bahia; CE = Ceará; ES = Espírito Santo; PR = Paraná; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo. Fonte: A autora, 2021.

A Figura 23 apresenta a relação entre as variantes encontradas neste estudo e em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico na forma de uma rede.

**Figura 23** - Rede da relação entre as variantes de alfa-herpesvírus 5 de quelonídeo (ChHV5) da linhagem B encontradas neste estudo e em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.



Legenda: Representação da rede das diferentes as variantes encontradas no presente estudo, onde o tamanho das circunferências é proporcional ao número de indivíduos que possuem essas variantes. A ocorrência dos indivíduos no Brasil está representada pelas cores: azul, vinho, vermelho, rosa e abóbora.

Fonte: A autora, 2021.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho se concentrou na detecção do alfaherpesvírus 5 quelonídeo (ChHV5) em amostras de tumor e de tecido saudável de tartarugas verdes da região de Angra dos Reis (RJ) acometidas pela fibropapilomatose. Os indivíduos de *Chelonia mydas* com FP analisados avaliados neste trabalho, conforme as tabelas 1 e 2 apresentadas nos resultados acima, foram todos (100%) classificados como juvenis. O valor médio do comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) foi de  $40,38 \pm 5,34$  cm (tanto para as tartarugas capturadas por mergulho, MT, quanto as capturadas por resgate de encalhes, RT); a largura curvilínea de carapaça (LCC) apresentou valor médio de  $35,9 \pm 4,84$  cm (para MT e RT); e o peso dos animais foi em média  $6,4 \pm 3,2$  kg. Estas medidas enquadram-se com os valores de referência de até 89 cm de CCC para tartarugas-verdes juvenis, descritos por Pritchard e Mortimer (1999). Estudos que analisaram adultos e jovens observaram frequência maior em juvenis, como nos resultados obtidos por Ene e colaboradores (2005), que observaram que os indivíduos acometidos pela FP possuíam uma amplitude de variação de comprimento de 29 cm a 61 cm, em habitats neríticos (perto da costa). Em outro estudo realizado no Brasil, no Rio Grande do Norte e Ceará, a frequência de indivíduos juvenis (28,6%) com FP foi muito maior em comparação aos adultos (4,3%) (DA SILVA-JÚNIOR et al., 2019), com tartarugas que tinham uma amplitude de variação de comprimento de 25 cm a 118,33 cm. Em Chaves e colaboradores (2017), 57,7% dos indivíduos com FP eram juvenis e apenas 9,8% adultos, mais uma vez provando que a maior classe de tartarugas acometidas foi de juvenis. O motivo para que tartarugas nesta etapa do ciclo de vida serem mais afetadas seria que estas tartarugas entraram em contato com o vírus no momento em que se dirigem do mar aberto para o ambiente costeiro, seu local de alimentação (ENE et al., 2005). Visto que a expressão da fibropapilomatose vem sendo relacionada com a baixa imunidade, outra explicação para a maior taxa de contágio ser em juvenis é justamente o fato de que nestes, o sistema imunológico não é completamente desenvolvido. Por este motivo, os adultos, que também vão para áreas de alimentação, teriam menor chance de contrair o vírus (TAGLIOLATTO et al., 2016). Porém, Zamana e colaboradores (2021) discordam deste pensamento, apontando que os adultos são os mais suscetíveis. Isto mostra a necessidade de futuras investigações sobre a imunogenicidade da fibropapilomatose.

Os animais coletados no mergulho de captura intencional (MT) estavam todos vivos, portanto suas respectivas amostras estavam mais íntegras para realizar as análises genéticas. Já as amostras referentes aos animais originados via a rede remota de resgate de encalhes (RT),

não estavam em bom estado de conservação, visto que vieram, em sua maior parte, de indivíduos mortos. Alguns DNAs genômicos extraídos apresentavam ‘arrasto’ intenso, sinalizando uma degradação dos fragmentos de alto peso. Apesar disto, conseguimos extrair o DNA genômico total de todas as 58 amostras trabalhadas (Tabela 3) e amplificamos o fragmento da DNA polimerase (DNAPol) do ChHV5 de cerca de 48% das amostras extraídas, conforme apresentado na tabela 4. Naturalmente, nesta dissertação há maior carga de alfa-herpevírus em tumores do que no tecido saudável do mesmo indivíduo, e as amostras de tumor geram melhores resultados no quesito detecção do DNA, esse resultado foi similar ao obtido por Work e colaboradores (2015). As razões da dificuldade de amplificação de 29 (~52%) das 56 amostras analisadas podem ter sido a presença de produtos da extração que inibiram a reação de PCR, quantidade de DNA genômico não ajustada, DNA genômico muito degradado (oriundo de carcaças de tartarugas em decomposição), ou ainda, a ausência ou presença indetectável do vírus no tecido saudável da tartaruga acometida por fibropapilomas. A presença do DNA de ChHV5 em amostras de tecido saudável de animais com FP foi observada em diversos estudos e diferentes locais do globo (57% no Havaí, LU et al. 2000; 48% em Porto Rico, PAGE-KARJIAN et al. 2012; 58% na Costa Rica e Nicarágua, CHAVES et al., 2017). O uso da PCR convencional foi satisfatório para detectar e amplificar o vírus nas amostras de interesse neste trabalho. Em Rodenbusch e colaboradores (2014) a técnica da PCR convencional também foi usada e foi possível detectar as variantes virais, confirmando também a eficácia da técnica neste tipo de análise.

Após o sequenciamento, conseguimos identificar duas variantes virais nos animais da região de Angra dos Reis (R.J.), as variantes B7 e B8, como apresentado nas tabelas 5 e 6. Em Monezi e colaboradores (2016), a variante B7 também foi a mais presente, com sua detecção em 21 das 25 sequências obtidas para o estado de São Paulo, sendo as outras quatro sequências da variante B8. Rodenbusch e colaboradores (2012), também com amostras do Brasil, reportaram cinco variantes distintas: B1 (para o Ceará), B2 (para a Bahia), B7 (para o Espírito Santo e São Paulo), B8 e B9 (para São Paulo). Considerando que as amostras B1 são comuns na região da Flórida (USA, QUACKENBUSH et al. 1998; ENE et al. 2005) e está presente no Caribe (Barbados, QUACKENBUSH et al. 2001), geograficamente faz sentido a presença da variante B1 no Ceará (existe uma reconhecida afinidade das faunas do Nordeste do Brasil e do Caribe). Já Domiciano e colaboradores (2019), dados não publicados disponíveis no Gene Bank, descrevem as variantes do ChHV5 presentes no Paraná, Sul do Brasil, mais especificamente a variante A, que apresenta afinidade com a região do Pacífico (frequente na Costa Rica e Nicarágua, CHAVES et al. 2017; presente no México, QUACKENBUSH et al.

2001; e, também, na Flórida e Porto Rico, GREENBLATT et al. 2005a), além da presença das variantes B7, B8 e da B10, típicas do Atlântico. Patrício e colaboradores (2012) também identificaram a variante B7, que prevaleceu entre os indivíduos (8 em 12) na África (Ilha Príncipe) e no Caribe (Porto Rico). Além da variante B7, apareceram as variantes B11 (1), B12 (1), B13 (1), na Ilha Príncipe e B14 (1), em Porto Rico (ver Tabela 6). Das 15 amostras desta dissertação para a variante B7, nove eram originárias de mergulho de captura intencional e cinco da rede de resgate de encalhes, já para a variante B8, duas amostras eram de mergulho e quatro da rede de resgate de encalhes, o que nos mostra que também é possível realizar identificação em tecidos mais degradados. As razões da dificuldade de sequenciamento das cinco amostras, das 26 sequenciadas, que não geraram sequencias aproveitáveis podem ser a quali- ou quantidade do produto da PCR, o rendimento da purificação dos produtos de amplificação, ou ainda, erro na seleção de amostras que não amplificaram (caso das amostras MT116P e MT116TS).

Outro fato que chamou bastante atenção neste trabalho foi que as amostras de tecido saudável (TS) e papiloma/tumor (P), referentes à uma mesma tartaruga (MT 146), apresentaram variantes diferentes, as variantes B8 e B7, respectivamente. Um resultado similar, foi encontrado por Ene e colaboradores (2005), que identificou uma tartaruga proveniente de Indian River Lagoon (USA) infectada com as variantes A e B. Outro estudo, realizado por Domiciano e colaboradores (2019), também apresentou este resultado com as respectivas variantes A e B identificadas em um mesmo indivíduo. Isso pode ser consequência do padrão migratório entre a área de nidificação e a de forrageamento, indivíduos de diferentes locais/origens natais podem ter contato e transmitirem ou se infectarem com diferentes variantes do ChHV5. No Brasil, vimos que tartarugas-verdes portando as variantes B7 e B8 estão distribuídas no Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo), e Sul (Paraná) do Brasil (RODENBUSCH et al., 2014; MONEZI et al., 2016; DOMICIANO et al., 2019; e esta dissertação).

Na tabela 7, podemos observar que (1) no ano de 2013, todas (100%) as amostras possuem a variante B7; (2) nos anos 2014 e 2015, ambas as variantes B7 e B8 foram identificadas em proporções decrescentes de B7 (89% e 50%, respectivamente para 2014 e 2015) e crescentes de B8 (11% e 50%, respectivamente para 2014 e 2015); e (3) no ano de 2016, apenas a variante B8 (100%) foi registrada. Isto pode sugerir uma possível mutação, a partir do final de 2014, de B7 para B8, visto que as variantes diferem em apenas um passo mutacional (Guanina para Adenina, ver Figura 21 e 23).

**Tabela 7** - Identificação das variantes do ChHV5, com N° de Acesso, Ano de coleta das amostras, País / Região, tipo de Grupo / Variante, % de variantes, em vários locais dos Oceanos Atlântico e do Pacífico.

N° de Acesso	Ano	País / Região	Grupo / Variante	% das variantes
Amostra_1_MT45TS	2013	Brasil, RJ	B7	
Amostra_2_MT45P	2013	Brasil, RJ	B7	
Amostra_9_MT36P	2013	Brasil, RJ	B7	
Amostra_13_MT48TS	2013	Brasil, RJ	B7	
Amostra_20_RT30TS	2013	Brasil, RJ	B7	100% B7
Amostra_8_RT90P	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_15_MT62TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_16_MT67TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_18_MT87TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_21_RT40TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_22_RT42TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_23_RT50TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_24_RT51TS	2014	Brasil, RJ	B7	
Amostra_10_MT101P	2014	Brasil, RJ	B8	89% B7, 11% B8
Amostra_6_MT146P	2015	Brasil, RJ	B7	
Amostra_19_MT114TS	2015	Brasil, RJ	B7	
Amostra_5_MT146TS	2015	Brasil, RJ	B8	
Amostra_11_RT146P	2015	Brasil, RJ	B8	50% B7, 50% B8
Amostra_12_RT164P	2016	Brasil, RJ	B8	
Amostra_25_RT168TS	2016	Brasil, RJ	B8	
Amostra_26_RT197TS	2016	Brasil, RJ	B8	100% B8

Onde: RJ = Rio de Janeiro. As cores em três tons de verde, referem-se aos anos de coleta das amostras. As cores em dois tons de azul, se referem as diferentes variantes, B7 ou B8.

Fonte: Fonte: A autora, 2022.

Os altos valores de *bootstrap* observados na árvore de Máxima Verossimilhança (ver Figura 22) mostram que as sequências obtidas nesta dissertação (Figura 22, variante B8, marcada em azul real; e B7, marcada em verde) são significativamente próximas e relacionadas entre si do ponto de vista filo genético. Podemos notar que as a maioria das sequências obtidas por outros autores para amostras do Brasil se concentram nas variantes B7 e B8 (RODENBUSCH et al., 2012; MONEZI et al., 2016; DOMICIANO et al., 2019). Temos um total de 60 variantes descritas para o Brasil, sendo: 41 B7 (68,3%), 13 B8 (21,7%), e seis (10%) outras variantes (essa dissertação: 15/21 B7 e 6/21 B8; RODENBUSCH et al., 2012: 2/6 B7 e 1/6 B8; MONEZI et al., 2016: 21/25 B7 e 4/25 B8; DOMICIANO et al., 2019 e dados não publicados: 3/8 B7 e 2/8 B8). A árvore de Máxima Verossimilhança também mostra a relação do clado B com o clado A, este último foi encontrado em sequências no Brasil, só que em menor

quantidade (2/60 ou 3,3 % A, DOMICIANO et al., 2019). Tudo isso nos leva a ressaltar que há, possivelmente, um fluxo de genes (transmissão horizontal) entre as tartarugas verdes analisadas nesta dissertação e nos estudos realizados em outras regiões do Atlântico e do Pacífico. A transmissão horizontal foi detectada por Jones e colaboradores (2020).

Na rede de variantes/haplótipos/grupos apresentada na figura 23, pode-se ver claramente que para o Brasil, as variantes observadas nesse estudo, B7 e B8, são as variantes mais frequentes. Isso pode ser visto pelo diâmetro dos círculos (proporcionais as frequências das variantes), que são maiores para B7 e B8 (seguidos de B1 e B4), sendo B7 a mais frequente. Nesta rede, pode-se observar um arranjo em forma de ‘estrela’, com a variante B7 sendo a mais frequente e provavelmente a mais ancestral. É importante ressaltar que B4, B8, B9, B10, B11 e B12 possuem apenas um passo mutacional a partir de B7, e que B5, B13 e B14 distam dois e B6, três passos mutacionais de B7. Já B1, B2 e B3 estão bem mais distantes de B7, com quatro e cinco mutações de diferença, respectivamente. As variantes B3 (Costa Rica), B4 (Havaí, Costa Rica), B5 e B6 (Austrália) tem maior ocorrência no Pacífico, enquanto B1 e B2 ocorrem no Atlântico Norte (Flórida), no Caribe (Barbados) e Nordeste do Brasil.

A principal contribuição desta dissertação é o registro das variantes B7 e B8 para tartarugas-verdes na região de forrageamento de Angra dos Reis (R.J.), e a determinação de alteração da frequência de ocorrência das variantes ao longo do período analisado, de 2013 a 2016. A ocorrência de mais de uma variante do alfa-herpesvírus quelonídeo 5 (ChHV5) em uma mesma tartaruga indica a possibilidade de contaminação em diferentes locais, antes e após a chegada na região costeira (WHITMORE et al. 2021). Também houve ótimo rendimento da amplificação do fragmento da DNAPol, tanto em tecido saudável e papiloma de tartarugas-verdes com fibropapilomatose, comprovando a utilização do PCR convencional para a identificação das variantes.



## CONCLUSÕES

- A prevalência da fibropapilomatose em tartarugas-verdes da área de alimentação da região de Angra dos Reis (R.J.), no período de 2013 a 2016, foi de 14,4% (58 tartarugas acometidas em 404 capturadas);
- Dois haplótipos do gene da DNAPol do vírus ChHV5 (variantes virais), B7 e B8, foram identificadas em amostras de tumor e tecido saudável de tartarugas-verdes com fibropapilomas, da região de Angra dos Reis (R.J.).
- As variantes B7 e B8 são predominantes nos indivíduos da região Sudeste-Sul do Brasil.
- A detecção do alfa-herpesvírus 5 de quelonídeos (ChHV5) e suas variantes nos animais da região de forrageamento de Angra dos Reis (R.J.) registra o estado de alteração do meio ambiente local.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Esse trabalho pode ser complementado com análises de mais indivíduos da população de tartarugas verdes de Angra dos Reis (RJ). Embora não tenha sido possível a execução de amplificações entre indivíduos clinicamente saudáveis, conseguimos resultados satisfatórios com as acometidas por fibropapilomatose.

Novos ensaios com animais infectados e aparentemente saudáveis são necessários a fim de que se possa entender melhor a disseminação e expressão dos sinais clínicos, bem como a etiologia da fibropapilomatose. Além disso, estudos envolvendo a dinâmica populacional, suas origens natais, filogenia, impactos que favorecem a disseminação e expressão da FP, permitiriam conhecer mais a respeito do funcionamento do vírus em questão. Todas essas observações se fazem necessárias para que o manejo correto realizado nos locais onde há indivíduos doentes seja feito e para que a taxa de indivíduos infectados seja reduzida.

## REFERÊNCIAS

- ABEL P., WERNEBURG I. 2021. Morphology of the temporal skull region in tetrapods: research history, functional explanations, and a new comprehensive classification scheme. *Biological Reviews*, v. 96, p. 2229–2257. <https://doi.org/10.1111/brv.12751>.
- ADNYANA W., LADDS P.W., BLAIR, D. 1997. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Australian Veterinary Journal*, v. 75, n. 10, p. 737–742. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb12258.x>
- AGUIRRE AA, BALAZS GH. 2000. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. *Comparative Haematology International*, 10(3), 132-137.
- ALFARO-NÚÑEZ, A, GILBERT MTP. 2014. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in latent turtle infections. *Journal of virological methods*, 206, 38-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.05.019>.
- ALFARO-NÚÑEZ A., BERTELSEN M.F., BOJESSEN A.M., RASMUSSEN I., ZEPEDA-MENDOZA L., OLSEN M.T., GILBERT M.T.P. 2014. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 1-12. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/14/206>. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-02026-z>.
- ALFARO-NÚÑEZ A., BOJESSEN A.M., BERTELSEN M.F., WALES N., BALAZS G.H., GILBERT M.T.P. 2016. Further evidence of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) latency: high levels of ChHV5 DNA detected in clinically healthy marine turtles. *PeerJ*, 4, e2274. DOI 10.7717/peerj.2274.
- ALMEIDA A.P., SANTOS A.J.B., THOMÉ J.C.A., BELINI C., BAPTISTOTTE C., MARCOVALDI M.A., SANTOS A.S., LOPEZ-MENDILAHARSU M. 2011. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, Ano I, n. 1, p. 12-19. <https://doi.org/10.37002/biobrasil.v1i1.87>.
- ÁLVAREZ-VARAS R., BERZINS R., BILO K., CHEVALIER J., CHEVALLIER D., De THOISY B., FALLABRINO A., CRUZ M.G., KELEZ S., LOPEZ-MENDILAHARSU M., MARCOVALDI M.A., MAST R.B., MEDRANO C., MIRANDA C., NALOVIC M.A., PROSDOCIMI L., RGUEZ-BARÓN J.M., SANTOS A., SOARES L.S., THOME J., VALLEJO F., VÉLEZ-RUBIO G. 2016. Sea turtles of South America. SWOT Report. v. 11, p. 14-27.
- ARIEL E., NAINU F., JONES K., JUNTUNEN K., BELL I., GASTON J. 2017. Phylogenetic Variation of Chelonid Alphaherpesvirus 5 (ChHV5) in Populations of Green Turtles *Chelonia mydas* along the Queensland Coast, Australia. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 29, n. 3, p. 150–157. <https://doi.org/10.1080/08997659.2017.1330783>.
- AWABDI D. R., PESTANA I. A., VIGLIAR BONDIOLI A. C., ZAPPES, C. A., MADEIRA Di BENEDITTO, A. P. 2021. Incidental capture of sea turtles in southeast Brazil: Assessment of the perceptions of artisanal fishers. *Ocean & Coastal Management*, v. 210. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2021.105696>.
- AWABDI D. R., SICILIANO S., Di BENEDITTO A. P. M. 2013. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Chelonia mydas* (L. 1758), na costa leste do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Biotemas*, v. 26, n. 1. p. 197-200. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n1p197>.

- BAINES C., LEREBOURS A., THOMAS F., FORT J., KREITSBERG R., GENTES S., MEITERNA R., SAKSE L., UJVARIF B., GIRAUDEAU M., SEPP T. 2021. Linking pollution and cancer in aquatic environments: A review. *Environment International*, v. 149, p. 106391. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106391>.
- BAPTISTOTTE C. 2007. Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BINDACO ALS, LIESNER CO, de CARVALHO NUNES L. 2020. Capítulo 5. Principais agentes infecciosos em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). *Tópicos Especiais em Ciência Animal IX*, p. 82-95.
- BLACKBURN NB, LEANDRO AC, NAHVI N, DEVLIN MA, LEANDRO M, ESCOBEDO IM, PERALTA JM, GEORGE J, STACY BA, de MAAR TW, BLANGERO J, KENIRY M, CURRAN J. E. 2021. Transcriptomic profiling of fibropapillomatosis in green sea turtles (*Chelonia mydas*) from South Texas. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. 630988. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630988>.
- CÁRDENAS DM, CUCALON RV, MEDINA-MAGUES LG, JONES K, ALEMAN RA, ALFARO-NUNEZ A. 2019. Fibropapillomatosis in a Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) from the Southeastern Pacific. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 55, n. 1, p. 169-173. <https://doi.org/10.7589/2017-12-295>.
- CASTILHOS JC, COELHO CA, ARGOLO JF, SANTOS EAP, MARCOVALDI MA, SANTOS AS, LOPEZ-MENDILAHARSU M. 2011. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, Ano I, v. 1, n. 1, p. 28-36. <https://doi.org/10.37002/biobrasil.v1i.89>.
- CHALOUPKA M, WORK TM, BALAZS GH, MURAKAWA SKK, MORRIS R. 2008. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982-2003). *Marine Biology*, v. 154, n. 5, p. 887-898. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-0981-4>.
- CHAVES A, AGUIRRE AA, BLANCO-PEÑA K, MOREIRA-SOTO A, MONGE O, TORRES AM, SOTO-RIVAS JL, LU Y, CHACÓN D, FONSECA L, JIMÉNEZ M, GUTIÉRREZ-ESPELETA G, LIERZ M. 2017. Examining the Role of Transmission of Chelonid Alphaherpesvirus 5. *Ecology & Health*, v. 14, p. 530-541. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1248-7>.
- CHIARI Y, CAHAIS V, GALTIER N, DELSUC F. 2012. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biology*, v. 10, n. 1, p. 1-15. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/65>.
- CRAWFORD NG, FAIRCLOTH BC, Mc CORMACK JE, BRUMFIELD RT, WINKER K, GLENN TC. 2012. More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. *Biology Letters*, v. 8, n. 5, p. 783-786. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2012.0331>.
- CRAWFORD NG, PARHAM JF, SELLAS AB, FAIRCLOTH BC, GLENN TC, PAPPENFUSS TJ, HENDERSON JB, HANSEN MH, SIMISON WB. 2015. A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 83, p. 250-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.021>.
- D'AMATO ME, CORACH D. 1996. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Cardinea, Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology*, v. 16, n. 4, p. 650-655. <https://doi.org/10.1163/193724096X00720>.

- DA SILVA CC, KLEIN RD, BARCAROLLI IF, BIANCHINI A. 2016. Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007>.
- DA SILVA-JÚNIOR ES, SOARES E, de FARIAS DSD, BONFIM AC, FREIRE ACB, REVORÊDO RA, ROSSI S, MATUSHIMA ER, GRISI-FILHO JHH, SILVA FJL, GAVILAN AS. 2019. Stranded Marine Turtles in Northeastern Brazil: Incidence and Spatial-temporal Distribution of Fibropapilomatosis. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 18, n. 2, p. 249-258. <https://doi.org/10.2744/CCB-1359.1>.
- DA SILVA-JÚNIOR ES, ROSSI S, ZAMANA RR, GATTAMORTA MA, FREIRE ACB, REVORÊDO RA, FARIAS DSD, SACRISTÁN C, BOMFIM AC, MATUSHIMA ER, SILVA FJL, GAVILAN AS. 2021. Chelonid Alphaherpesvirus 5 in cutaneous tumors of green turtles (*Chelonia mydas*) stranded in Northeastern Brazil. *Archives of Veterinary Science*, v.26, n.4, p.01-16.
- DELISLE A, KIM KM, STOECKL N, LUI WF, MARSH H. 2018. The socio-cultural benefits and costs of the traditional hunting of dugongs *Dugong dugon* and green turtles *Chelonia mydas* in Torres Strait, Australia. *Oryx- The International Journal of Conservation*, v. 52, n. 2, p. 250-261. <https://doi.org/10.1017/S0030605317001466>.
- DE MELO LF, CABRERA ML, RODRIGUES ACB, TURQUETTI ADOM, da SILVA AF, FRANCIOLLI ALR, LOPES EQ, RICI REG. 2020. Morphophysiology of the green-turtle salt gland *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 3, n. 2, p. 723-731. <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n2-032>.
- DE MELLO DM, ALVAREZ MC. 2020. Health assessment of juvenile green turtles in southern São Paulo State, Brazil: A hematologic approach. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 32, n. 1, p. 25-35. <https://doi.org/10.1177/1040638719891972>.
- DOMICIANO IG, BROADHURST MK, DOMIT C, FLAIBAN KKMC, GOLDBERG DW, FRITZEN JTT, BRACARENSE APFRL. 2019. Chelonid Alphaherpesvirus 5 DNA in Fibropapillomatosis Affected *Chelonia mydas*. *EcoHealth*, v. 16, p. 248-259. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01412-8>.
- DOS SANTOS RG, MARTINS AS, TOREZANI E, BAPTISTOTTE C, da NÓBREGA FARIAS J, HORTA PA, WORK TM, BALAZS GH. 2010. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Disease of Aquatic Organisms*, v. 89, n. 1, p. 87-95. <https://doi.org/10.3354/dao02178>.
- DOS SANTOS RG, MARTINS AS, FARIAS da NOBREGA F, HORTA PA, PINHEIRO HT, TOREZANI E, BAPTISTOTTE C, SEMINOFF JA, BALAZS GH, WORK TM. 2011. Coastal habitat degradation and green sea turtle diets in Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 6, p. 1297-1302. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.004>.
- DuBOIS MJ, PUTMAN NF, PIACENZA SE. 2021. A global assessment of the potential for ocean-driven transport in hatchling sea turtles. *Water*, v. 13, n. 16, p. 757. <https://doi.org/10.3390/w13060757>.
- DUTTON PH, STEWART KR. 2013. A Method for Sampling Hatchling Sea Turtles for the Development of a Genetic Tag. *Marine Turtle Newsletter*, v. 138, p. 3-7.
- ENE A, LEMAIRE S, ROSE C, SCHAFF S, MORETTI R, LENZ J, HERBST LH. 2005. Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41, n. 3, p. 489-497. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.3.489>.

- EHRHART LM. 1991. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River Lagoon, Florida: distribution over time and area. In: Balazs, G. H., Pooley, S. G. (eds) Research plan for marine turtle fibropapilloma. US Dept Commerce, NOAA Tech Memo NOA Tech Memo NMFS-SWFSC-156, p. 59-61.
- EVANS DR, CARTHY RR, CERIANI SA. 2019. Migration routes, foraging behavior, and site fidelity of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) satellite tracked from a globally important rookery. *Marine Biology*, v. 166, n.134, p. 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3583-4>.
- EVERS SW, BENSON RB. 2019. A new phylogenetic hypothesis of turtles with implications for the timing and number of evolutionary transitions to marine lifestyles in the group. *Palaeontology*, v. 62, n. 1, p. 93-134. <http://dx.doi.org/10.1111/pala.12384>.
- FIGGENER C, CHACÓN-CHAVERRI D, JENSEN MP, FELDHAAR H. 2016. Paternity revisited in a recovering population of Caribbean leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 475, p. 114-123. <https://doi.org/j.jembe.2015.11.014>.
- FOLEY AM, SCHROEDER BA, REDLOW AE, FICK-CHILD KJ, TEAS WG. 2005. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980–98): trends and associations with environmental factors. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41 n. 1, p. 29–41. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.1.29>.
- FONG JJ, BROWN JM, FUJITA MK, BOUSSAU B. 2012. A Phylogenomic approach to vertebrate phylogeny supports a turtle-Archosaur affinity and a possible paraphyletic Lissamphibia. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e48990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048990>
- FORMIA A. 2002. Population and genetic structure of the green turtle (*Chelonia mydas*) in west and central Africa; implications for management and conservation. Thesis for Doctor of Philosophy. Cardiff University, País de Gales, Reino Unido.
- GAOS AR, LEWISON RL, LILES MJ, HENRIQUEZ A, CHAVARRÍA S, YAÑEZ IL, STEWART K, FREY A, JONES TT, DUTTON PH. 2018. Prevalence of polygyny in a critically endangered marine turtle population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 5, n. 24, p. 5758-5769. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.06.004>.
- GODLEY BJ, BRODERICK AC, COLMAN LP, FORMIA A, GODFREY MH, HAMANN M, NUNO A, OMEYER MO, PATRÍCIO AR, PHILLOTT AD, REES AR, SHANKER K. 2020. Reflections on sea turtle conservation. *Oryx - The International Journal of Conservation*, v. 54, n. 3, p. 287-289. <http://dx.doi.org/10.1017/S0030605320000162>.
- GONZÁLEZ-GARZA BI, STOW A, SÁNCHEZ-TEYER LF, ZAPATA-PÉREZ O. 2015. Genetic variation, multiple paternity, and measures of reproductive success in the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Ecology and Evolution*, v. 506, n. 24, p. 5758-5769. <https://doi.org/10.1002/ece3.1844>.
- GREENBLATT RJ, BALAZS GH, CASEY JW, WORK TM, DUTTON P, SUTTON CA, SPRAKER TR, CASEY RN, DIEZ CE, PARKER D, St LEGER J, BALAZS GH, CASEY JW. 2005b. Geographic variation in marine turtle fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 36, n. 3, p. 527–30. <https://doi.org/10.1638/04-051.1>.
- GREENBLATT RJ, QUACKENBUSH SL, CASEY RN, ROVNAK J, BALAZS GH, WORK TM, ... SUTTON, C. A. 2005a. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. *Journal of virology*, v. 79, n. 2, p. 1125-1132. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1125-1132.2005>.
- HEDGES SB. 2012. Amniote phylogeny and the position of turtles. *BMC biology*, v. 10, n. 64, p. 10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-64>.

- HEDGES SB, MOBERG KD, MAXSON LR. 1990. Tetrapod phylogeny inferred from 18S and 28S ribosomal RNA sequences and a review of the evidence for amniote relationships. *Molecular Biology and Evolution*, v. 7, n. 6, p. 607–633. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040628>.
- HERBST LH. 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 4, p. 389–425. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90037-X).
- HERBST L, ENE A, SU M, DESALLE R, LENZ J. 2004. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. *Current Biology*, v. 14, n. 17, p. R697–R699. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.040>.
- HICKMAN J, CLEVELAND P, ROBERTS LS, KEEN S, EINSENHOUR DJ, LARSON A, ANSON H. 2010. *Princípios Integrados de Zoologia*, 16 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 950 p.
- IUCN, International Union for Conservation of Nature. 2021. Red List of Threatened Species, <https://www.iucnredlist.org/>.
- JAMES S, DONATO D, de THOISY B, LAVERGNE A, LACOSTE V. 2020. Novel herpesviruses in neotropical bats and their relationship with other members of the Herpesviridae family. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 84, p. 104367. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104367>.
- JAMES A, PAGE-KARJIAN A, CHARLES KE, EDWARDS J, GREGORY CR, CHEETHAM S, BUTER BP, MARANCIK DP. 2021. Chelonid Alphaherpesvirus 5 prevalence and first confirmed case of sea turtle fibropapillomatosis in Grenada, West Indies. *Animals*, v. 11, n. 6, p. 1490. <https://doi.org/10.3390/ani11061490>.
- JENSEN MP, FITZSIMMONS NN, BOURJEA J, HAMABATA T, REECE J, DUTTON PH. 2019. The evolutionary history and global phylogeography of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Journal of Biogeography*, v. 46, n. 5, p. 860–870. <http://doi.org/10.1111/jbi.13483>.
- JENSEN MP, FITZSIMMONS NN, BOURJEA J, HAMABATA T, REECE J, JOHNSON RA, GULICK AG, BOLTEN AB, BJORNDALE KA. 2017. Blue carbon stores in tropical seagrass meadows maintained under green turtle grazing. *Scientific Reports*, v. 7, n. 13545, p. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13142-4>.
- JONES K, ARIEL E, BURGESS G, READ M. 2016. A review of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*). *The Veterinary Journal*, v. 212, p. 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.041>.
- JOSEPH J, CHONG J, SHAW P. 2017. Multiple paternity in egg clutches of green turtles in Redang Island and Sabah Turtle Islands Park, Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management*, v. 12, n. 1, p. 12–22.
- JOYCE WG. 2007. Phylogenetic relationships of Mesozoic turtles. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, v. 48, n. 1, p. 3–102. [https://dx.doi.org/10.3374/0079-032X\(2007\)48\[3:PROMT\]2.0.CO;2](https://dx.doi.org/10.3374/0079-032X(2007)48[3:PROMT]2.0.CO;2).
- LAFFOLEY D, BAXTER JM. 2016. Explaining Ocean warming: Causes, scale, effects and consequences. Full report. Gland, Switzerland: IUCN. 456 p.
- LAWRENCE MF, MANSFIELD KL, SUTTON E, SAVAGE AE. 2018. Molecular evolution of fibropapilloma-associated herpesviruses infecting juvenile green and loggerhead sea turtles. *Virology*, v. 521, p. 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.012>.
- LOGANATHAN AL, PALANIAPPAN P, SUBBIAH VK. 2021. Evidence of chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) in green turtles (*Chelonia mydas*) from Sabah, Borneo. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428031>.
- LU Y, AGUIRRE AA, WORK TM, BALAZS GH, NERURKAR VR, YANAGIHARA R. 2000. Identification of a small, naked virus in tumor-like aggregates in cell lines derived from a green turtle, *Chelonia mydas*, with fibropapillomas. *Journal of Virological Methods*, v. 86, n. 1, p. 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00175-5).

- LU Y, WANG Y, YU Q, AGUIRRE AA, BALAZS GH, NERURKAR VR, YANAGIHARA R. 2000. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. *Archives of virology*, v. 145, n. 9, p. 1885-1893. <https://doi.org/10.1007/s007050070063>.
- LUTZ PL, MUSICK JA. 1997. *The Biology of Sea Turtles*, v. 1, 446 p.
- LYSON TR, BEVER GS. 2020. Origin and evolution of the turtle body plan. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 51, p. 143-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024746>.
- MARCOVALDI MA, LOPEZ GG, SOARES LS, SANTOS AJB, BELINI C, SANTOS AS, LOPEZ-MENDILAHARSU M. 2011. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, n. 1, p. 20-27. <https://doi.org/10.37002/biobrasil.v1i.89>.
- MARTINS HR, BJORN DAL KA, FERREIRA RL, PARRA HAE, PHAM CK, RODRIGUEZ Y, SANTOS MR, VANDEPERRE F, BOLTEN AB. 2018. Sea turtles: University of Florida – University of the Azores connection 1984 – present: A review. *Arquipelago Life and Marine Sciences*, v. 35, p. 85-94. <http://hdl.handle.net/10400.3/4926>. Sem doi
- MONEZI TA, MEHNERT DU, de MOURA EMM, MULLER NMG, GARRAFA P, MATUSHIMA ER, WERNECK MR, BORELLA MI. 2016. Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study. *Veterinary Microbiology*, v. 186, p. 150-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.020>.
- MOTANI R. 2009. The Evolution of Marine Reptiles. *Evolution: Education and Outreach*, v. 2, n. 2, p. 224-235. <http://dx.doi.org/10.1007/s12052-009-0139-y>.
- NARO-MACIEL E, REID BN, ALTER SE, AMATO G, BJORN DAL KA, BOLTEN AB, MARTIN M, NAIRN CJ, SHAMBLIN B, PINEDA-CATALAN O. 2014. From refugia to rookeries: Phylogeography of Atlantic green turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 461, p. 306-316, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.08.020>.
- NIGRELLI RF, SMITH GM. 1943. The occurrence of leeches, *Ozobranchus branchiatus* (Menzies), on fibro-epithelial tumors of marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica (NY)*, v. 28, n. 2, p. 107-108.
- PAGE-KARJIAN A, SERRANO ME, CARTZENDAFNER J, MORGAN A, RITCHIE BW, GREGORY CR, McNEILL JB, PERRAULT JR, CHRISTIANSEN EF, HARMS CA. 2020. Molecular Assessment of Chelonid Alphaherpesvirus 5 Infection in Tumor-free Green (*Chelonia mydas*) and Loggerhead (*Caretta caretta*) Sea Turtles in North Carolina, USA, 2015-2019. *Animals*, v. 10, n. 11, p. 1964. <http://doi.org/10.3390/ani10111964>.
- PAGE-KARJIAN A, TORRES F, ZHANG J, RIVERA S, DIEZ C, MOORE PA, MOORE D, BROWN C. 2012. Presence of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in tumored and non-tumored green turtles, as detected by polymerase chain reaction, in endemic and non-endemic aggregations, Puerto Rico. *SpringerPlus*, v. 1, n. 35, p. 1-8. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-35>.
- PARRILLA-BEL J, CANUDO JI, FORTUNY J, LLACER S. 2016. Glándulas de la sal en *Maledictosuchus riclaensis* (Metriorynchidae, Thalattosuchia) del Calloviense de la Península Ibérica. *Geological Society of Spain, Geogaceta*, v. 59, p. 63-66.
- PATRÍCIO AR, HERBST LH, DUARTE A, VÉLEZ-ZUAZO X, SANTOS LOUREIRO N, PEREIRA N, TAVARES L, TORANZOS GA. 2012. Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. *Journal of General Virology*, v. 93, n. 5, p. 1035. <https://doi.org/10.1099/vir.0.038950-0>.
- PATRÍCIO AR, DIEZ CE, VAN DAM RP, GODLEY BJ. 2016. Novel insights into the dynamics of green turtle fibropapillomatosis. *Marine Ecology Progress Series*, 547, 247-255. <https://doi.org/10.3354/meps11644>.



- PEREIRA AG, STERLI J, MOREIRA FR, SCHRAGO CG. 2017. Multilocus phylogeny and statistical biogeography clarify the evolutionary history of major lineages of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 113, p. 59-66. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.05.008>.
- POUGH FH, ANDREWS RM, CRUMP ML, SAVITZKY AH, WELLS KD, BRANDLEY MC. 2015. *Herpetology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Oxford University Press, 4<sup>th</sup> edition, 744 pp.
- PRITCHARD PCH, MORTIMER JA. 1999. Taxonomy, External Morphology, and Species Identification. In: ECKERT, K. L., BJORNDAL, K. A., ABREU-GROBOIS, F. A., DONNELLY, M. (Eds.), *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, n. 4, p. 21-38.
- PUTMAN NF, HAWKINS J, GALLAWAY BJ. 2020. Managing fisheries in a world with more sea turtles. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 287, n. 20200220, p.1-8. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2020.0220>.
- QUAKENBUSH SL, CASEY RN, MURCEK RJ, PAUL TA, WORK TM, LIMPUS CJ, CHAVES A, duTOIT L, PEREZ JV, AGUIRRE AA, SPRAKER TR, HORROCKS JA, VERMEER LA, BALAZS GH, CASEY JW. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real time PCR. *Virology*, v. 287, n. 1, p. 105-111. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1023>.
- QUACKENBUSH SL, WORK TM, BALAZS GH, CASEY RN, ROVNAK J, CHAVES A, duTOIT L, BAINES JD, PARRISH CR, BOWSER PR, CASEY JW. 1998. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology*, v. 246, n. 2, p. 392-399. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9207>.
- REES AF, CARRERAS C, BRODERICK AC, MARGARITOU LIS D, STRINGELL TB, GODLEY BJ. 2016. Are we working towards global research priorities for management and conservation of sea turtles? *Endangered Species Research*, v. 31, p. 337-382. <http://doi.org/10.3354/esr00801>.
- REES AF, CARRERAS C, BRODERICK AC, MARGARITOU LIS D, STRINGELL TB, GODLEY BJ. 2017. Linking loggerhead locations: using multiple methods to determine the origin of sea turtles in feeding grounds. *Marine Biology*, v. 164, n. 30, p. 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-3055-z>.
- RÊGO RSC, CUTRIM CHG, MIRANDA AS, CAMPOS JLA, ARAÚJO VA. 2021. Ethnozoology Mediating Knowledge About Sea Turtles and Environmental Education Strategies in the North-Central Coast of Rio De Janeiro, Brazil. *Tropical Conservation Science*, v. 14, p. 1-11. <http://doi.org/10.1177/19400829211023265>.
- RIEPEL O, de BRAGA M. 1996. Turtles as diapsid reptiles. *Nature*, v. 384, p. 453-455. <https://doi.org/10.1038/384453a0>.
- RIEPEL O, REISZ RR. 1999. The origin and early evolution of turtles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 30, n. 1, p. 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.1>.
- RITTEMBURG LT, KELLEY JR, MANSFIELD KL, SAVAGE E. 2021. Marine leech parasitism of sea turtles varies across host species, seasons, and the tumor disease fibropapillomatosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 143, p. 1-12. <https://doi.org/10.3354/dao03549>.
- RODENBUSCH CR, ALMEIDA LL, MARKS FS, ATAÍDE MW, ALIEVI MM, TAVARES M, PEREIRA RA, CANAL CW. 2012. Detection and characterization of fibropapilloma associated herpesvirus of marine turtles in Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 11, p. 1179-1183. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100018>.

- RODENBUSCH CR, BAPTISTOTTE C, WERNECK MR, PIRES TT, MELO MTD, DE ATAIDE MW. 2014. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brazil: characteristics of tumors and virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 111, n. 3, p. 207–217. <https://doi.org/10.3354/dao02782>.
- ROMAN L, SCHUYLER Q, WILCOX C, HARDESTY BD. 2021. Plastic pollution is killing marine megafauna, how do we prioritize policy to reduce mortality? *Conservation Letters*, v. 14, n. 2, p. 12781. <https://doi.org/10.1111/conl.12781>.
- ROSSI S, ZAMANA RR, de ANDRADE-SANTOS PP, da COSTA BONFIM A, de FARIAS DSD, da BOAVIAGEM FREIRE, AC, OLIVEIRA RM, GATTAMORTA MA, MATUSHIMA ER, de LORENA PIRES JM, SACRISTÁN C, da SILVA-JÚNIOR ES, de LIMA SILVA FJ, GAVILAN SA. 2021. Visceral neoplasms and Chelonid alphaherpesvirus 5 in green turtles with fibropapillomatosis. *Archives of Veterinary Science*, v. 26, n. 1, p. 63-79.
- SANTOS AS, SOARES e SOARES L, MARCOVALDI MA, MONTEIRO DS, GIFFONI B, ALMEIDA AP. 2011. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Caretta caretta* Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, Ano I, n. 1, p. 3-11.
- SARI F, KOSELER A, KASKA Y. 2017. First observation of multiple paternity in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, nesting on Dalyan Beach, Turkey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 488, p. 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.11.018>.
- SCHOCH RR, SUES H-D. 2020. The origin of the turtle body plan: evidence from fossils and embryos. *Palaeontology*, v. 63, n. 3, p. 375-393. <http://doi.org/10.1111/pala.12460>.
- SINAEI M, ZARE R, TALEBI MATIN, M., GHASEMZADEH, J. 2021. Marine Debris and Trace Metal (Cu, Cd, Pb, and Zn) Pollution in the Stranded Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, n. 3, p. 634–644. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00829-z>.
- SMITH GM, COATES CW, 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica (NY)*, v. 23, p. 93-98.
- STEWART KR, DUTTON PH. 2011. Paternal genotype reconstruction reveals multiple paternity and sex ratios in a breeding population of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Conservation Genetics*, v. 12, n. 4, p. 1101-1113. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0212-2>.
- TAGLIOLATTO AB, GUIMARÃES SM, LOBO-HAJDU G, MONTEIRO-NETO C. 2016. Characterization of fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* (Cheloniidae) captured in a foraging area in southeastern Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, v. 121, n. 3, p. 233-240. <http://doi.org/10.3354/dao03020>.
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- TEDESCHI JN, MITCHELL NJ, BERRY O, WHITING S, MEEKAN M, KENNINGTON W J. 2015. Reconstructed paternal genotypes reveal variable rates of multiple paternity at three rookeries of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in Western Australia. *Australian Journal of Zoology*, v. 62, n. 6, p. 454-462. <https://doi.org/10.1071/ZO14076>.
- THOMSON RC, SPINKS PQ, SHAFFER HB. 2021. A global phylogeny of turtles reveals a burst of climate-associated diversification on continental margins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 7, p. 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012215118>.
- TRUSCOTT Z, BOOTH DT, LIMPUS CJ. 2017. The effect of on-shore light pollution on sea-turtle hatchlings commencing their off-shore swim. *Wildlife Research*, v. 44, n. 2, p. 127-134, <http://doi.org/10.1071/WR16143>.

- TZIKA AC, HELAERS R, SCHRAMM G, MILINKOVITCH MC. 2011. Reptilian-transcriptome v1.0, a glimpse in the brain transcriptome of five divergent Sauropsida lineages and the phylogenetic position of turtles. *EvoDevo*, v. 2, n. 19, p. 1-18, <https://doi.org/10.1186/2041-9139-2-19>.
- UJVARI B, ROCHE B, THOMAS F. (Eds.), 2017. *Ecology and Evolution of Cancer*. Academic Press, Elsevier. 270 p.
- VAN HOUTAN KS, SMITH CM, DAILER ML, KAWACHI M., 2014. Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. *PeerJ*, v. 2, p. e602. <https://doi.org/10.7717/peerj.602>.
- VARGAS SM, ARAÚJO FC, SANTOS FR. 2009. DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 3, p. 608-612. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000050>.
- WALKER JF, BROWN JW, SMITH SA. 2018. Analyzing contentious relationships and outlier genes in phylogenomics. *Systematic biology*, v. 67, n. 5, p. 916-924. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy043>
- WANG Z, PASCUAL-ANAYA J, ZADISSA A, LI W, NI IMURA Y, HUANG Z, LI C, WHITE S, XIONG Z, FANG D, WANG B, MING Y, CHEN Y, ZHENG Y, KURAKU S, PIGNATELLI M, HERRERO J, BEAL K, NOZAWA M, LI Q, WANG J, ZHANG H, YU L, SHIGENOBU S, WANG J, LIU J, FLICEK P, SEARLE S, WANG J, KURATANI S, YIN Y, AKEN B, ZHANG G, IRIE N. 2013. The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nature Genetics*, v. 45, n. 6, p. 701– 706, <https://doi.org/10.1038/ng.2615>.
- WERNEBURG I, EVERS SW, FERREIRA G. 2021. On the “cartilaginous rider” in the endocasts of turtle brain cavities. *Vertebrate Zoology*, v. 71, p. 403-418. <https://doi.org/10.3897/vz.71.e66756>.
- WHITMORE L, YETSKO K, FARRELL JA, PAGE-KARJIAN A, DANIEL W, SHAVER DJ, FRANSEN HR, WALKER JS, CROWDER W, BOVERY C, RAMIA DR, BURKHALTER B, RYAN E, DUFFY DJ. 2021. Evolutionary comparisons of chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV5) genomes from fibropapillomatosis-afflicted Green (*Chelonia mydas*), Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) and Kemp’s Ridley (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. *Animals*, v. 11, p. 2489. <https://doi.org/10.3390/ani11092489>.
- WORK TM, BALAZS GH. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), 804-807.
- WORK TM, DAGENAIS J, BALAZS GH, SCHETTLE N, ACKERMANN M. 2015. Dynamics of virus shedding and in situ confirmation of chelonid herpesvirus 5 in Hawaiian green turtles with fibropapillomatosis. *Veterinary Pathology*, 52(6), 1195-1201. <https://doi.org/10.1177/0300985814560236>.
- WYNEKEN J. 2001. The anatomy of sea turtles. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 1-172 p., <http://ibimm.org.br/wp-content/uploads/2017/05/Wyneken-2001-The-anatomy-of-sea-turtles.pdf>.
- WYNEKEN J. 2013. The Skeleton: an in vivo view of structure. In: WYNEKEN J.; LOHMANN K.J.; MUSICK J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles, Volume III*, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, 465 p.
- ZAMANA RR, GATTAMORTA MA, OCHOA PFC, NAVAS-SUÁREZ PE, SACRISTÁN C, ROSSI S, GRISI-FILHO JHH, MATUSHIMA ER, SILVA IS. 2021. High occurrence of Chelonid Alphaherpesvirus 5 (ChHV5) in Green Sea Turtles *Chelonia mydas* with and without Fibropapillomatosis in Feeding Areas of the São Paulo Coast, Brazil. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 33, n. 4, p. 252-263. <https://doi.org/10.1002/aah.10142>.

## ANEXO A – Outros experimentos realizados durante a pesquisa.

O meu Curso de mestrado se iniciou com a minha candidatura, no segundo semestre de 2019, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ para desenvolver um projeto envolvendo paternidade múltipla da espécie de tartaruga marinha *Dermochelys coriacea*, no litoral do Espírito Santo. Devo dizer que a minha experiência em genética e nas técnicas de biologia molecular era nula, mas a vontade de trabalhar com essas tartarugas gigantes era um sonho desde o início da graduação. Tínhamos planejado estudar as consequências do rompimento das barragens do Rio Doce na nidificação e nascimento de filhotes de tartaruga de couro, em Regência, E.S. Apesar de termos firmado uma colaboração com a Dra. Sarah Maria Vargas, do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), que trabalha com a reprodução das tartarugas de couro, surgiram obstáculos. O principal foi a dificuldade de obter as amostras das mães e filhotes da espécie, e do tempo que isto demandaria levando em conta o período do mestrado e a necessidade de investir no meu treinamento nas técnicas de genética molecular, desta forma, o projeto foi alterado. Neste caso, não foi realizado nenhum experimento para esse projeto, apenas o treinamento nas técnicas básicas de extração de DNA genômico a partir de amostras de tartaruga e de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) da região controle do DNA mitocondrial, procedimentos já estabelecidos e de rotina do Laboratório de Genética Marinha (LGMar).

No início de 2020, uma nova proposta de projeto de dissertação, envolvia a amplificação de microssatélites para determinar as relações de parentesco em *Chelonia mydas* da região de Angra dos Reis (R.J.) (visto que já tínhamos as amostras no LGMar). Com o início da pandemia do COVID-19, e as dificuldades, tanto de acesso ao laboratório (regularizado após a vistoria sanitária em agosto de 2020), quanto de amplificação com o conjunto de iniciadores que possuímos (Cm 3, Cm 72, Cm 58, Cc 117, Or 7, Cc 7), metade deles heterólogos, desenvolvidos para outra espécie, *Caretta caretta*, novas dificuldades surgiram. Tivemos muita dificuldade para padronizar o protocolo de amplificação dos microssatélites, e consultando o Prof. Dr. Fabrício Rodrigues Santos, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), nosso colaborador (com experiência com microssatélites), soubemos que a equipe dele também encontrava dificuldades técnicas. O Dr. Fabrício ofereceu de me receber para tentar amplificar os microssatélites, com o apoio de uma aluna de doutorado, mas com o recrudescimento da pandemia do COVID-19 não foi possível realizar o trabalho na UFMG (que também estava funcionando com restrição de acesso). Assim, este segundo projeto também foi alterado. Neste caso, vários meses foram gastos na padronização da amplificação dos microssatélites, com sucesso de menos de 10% dos experimentos.

Em meados do ano de 2021, foi decidido trabalhar com o projeto apresentado nesta dissertação. A decisão de se trabalhar com este tema foi porque havia amostras disponíveis no LGMar de indivíduos acometidos com fibropapilomatose e, também, os iniciadores, GTHV2 e GTHV3, prontos para a amplificação do fragmento da DNA polimerase viral. Foi realizado, então, um teste piloto de amplificações pela PCR do material de interesse do estudo, tumor e tecido saudável de animais acometido com a FP. Com os resultados positivos do experimento piloto, foi dado prosseguimento ao projeto. Como apresentado nos resultados e na discussão, obtivemos resultados muito interessantes com este trabalho.

## ANEXO B – Cópia das Autorizações para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56709-1	Data da Emissão: 05/12/2016 07:06	Data para Revalidação*: 04/01/2018
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

\* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

## Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das <i>Chelonia mydas</i> do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição : UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Extração de DNA genômico	01/2017	10/2019
2	Amplificação por PCR (região controle e microssatélites)	01/2017	11/2019
3	Análise e purificação dos produtos de PCR	01/2017	11/2019
4	Revisão bibliográfica	01/2017	12/2019
5	Sequenciamento	01/2017	11/2019
6	Análise das sequências (edição, alinhamento, cálculo dos valores de diversidade haplotípica e índice)	01/2017	12/2019
7	Redação de resumos para congressos, relatório e manuscrito para publicação	05/2018	07/2018
8	Redação de resumos para congressos, relatório e manuscrito para publicação	10/2019	12/2019
9	Renovação da autorização	12/2019	12/2019

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

## Outras ressalvas

1	Os dados oriundos da marcação deverão ser inseridos semanalmente no Banco de Dados para a Gestão de conservação das Tartarugas Marinhas - BDCTAMAR. A pesquisadora titular desta autorização deverá enviar para o Centro TAMAR-ICMBio, ao final do desenvolvimento do projeto, cópia integral dos relatórios e publicações científica.
---	--

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	HUMBERTO MAS GITIRANA	executor	089.086.437-37	117986604 I/P-RJ	Brasileira
2	THALITA DIONÍSIO BELMONTE	executora	108.298.437-01	208716449 DETRAN-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 86981941



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 56709-1</b>	<b>Data da Emissão: 05/12/2016 07:06</b>	<b>Data para Revalidação*: 04/01/2018</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das Chelonia mydas do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição : UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	Efluente da usina nuclear de Angra dos Reis	Fors de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelonia mydas

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Captura manual
3	Método de marcação (Tartarugas marinhas)	"Tags"

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 86981941**



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56709-1	Data da Emissão: 05/12/2016 07:06	Data para Revalidação*: 04/01/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das Chelonia mydas do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição : UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 86981941**



Página 3/3





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56709-2	Data da Emissão: 05/01/2018 12:15	Data para Revalidação*: 04/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das Chelonia mydas do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição: UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56709-3	Data da Emissão: 17/10/2019 21:10:26	Data da Revalidação*: 01/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das Chelonia mydas do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56709-4	Data da Emissão: 25/01/2022 16:21:04	Data da Revalidação*: 01/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: GISELE LOBO HAJDU	CPF: 939.201.217-91
Título do Projeto: Caracterização genética e determinação da origem natal das Chelonia mydas do Projeto PROMONTAR - ANGRA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.540.014/0001-57